И. Ф. ЖИМУЛЁВ

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Издание четвертое, стереотипное третьему

Ответственные редакторы:
доктор биологических наук Е. С. Беляева
доктор биологических наук А. П. Акифьев

Рекомендовано Министерством образования и науки Российской Федерации в качестве учебного пособия для студентов университетов, обучающихся по направлению 510600 — Биология и биологическим специальностям

СИБИРСКОЕ УНИВЕРСИТЕТСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
НОВОСИБИРСК • 2007

УДК 575
ББК Е04
Ж66

Рекомендовано к печати
Ученым советом Новосибирского государственного университета

Рецензенты:

Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета

Заслуженный профессор Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, академик *Ю. П. Алтухов*

Заведующий кафедрой генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, академик РАН, профессор *С. Г. Инге-Вечтомов*

Директор Института биологии гена РАН, академик *Г. П. Георгиев*
Заведующий лабораторией, чл.-корр. РАН *Л. И. Корочкин*

Директор Института молекулярной генетики РАН, академик *Е. Д. Свердлов*
Заведующий лабораторией, чл.-корр. РАН *В. А. Гвоздев*

Издается с 2002 года

Жимулёв, И. Ф.
Ж66 Общая и молекулярная генетика [Текст]: учеб. пособие для вузов / И. Ф. Жимулёв; под ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева. — 4-е изд., стер. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. — 479 с.: ил.

ISBN-10: 5-379-00375-3
ISBN-13: 978-5-379-00375-3

Эта книга — учебное пособие нового поколения, которое отражает современное состояние генетики и уровень ее преподавания. По широте охвата актуальных направлений общей и молекулярной генетики, насыщенности новейшим фактическим материалом оно выгодно отличается от предшествующих ему учебных изданий по генетике.

В пособии подробно изложены современные сведения по биотехнологии, молекулярной генетике и генной инженерии, представлены новейшие данные, полученные с использованием методов генного клонирования, полимеразной цепной реакции, трансформации у эукариот. По-новому освещены вопросы генетики определения пола, генетики индивидуального развития, организации хромосом и внехромосомных ДНК. Рассмотрены современные методики молекулярной генетики.

Для студентов, аспирантов и преподавателей университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных вузов.

УДК 575
ББК Е04

ISBN-10: 5-379-00375-3
ISBN-13: 978-5-379-00375-3

© Жимулёв И. Ф., 2007
© Сибирское университетское издательство, 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие ко второму изданию 7
Предисловие к первому изданию 8

Глава 1. **Общие положения: предмет и история развития генетики** 9

1.1. Предмет генетики 9
Рекомендуемые учебники и пособия 9
1.2. Краткая история развития представлений о наследственности 10
1.3. Краткий очерк истории генетики в России 20
Московская школа генетики 26
Кафедра генетики Санкт-Петербургского университета 27
Институт цитологии и генетики СО РАН 27

Глава 2. **Менделизм — дискретность в наследовании признаков** 31

2.1. Моногибридное скрещивание 31
2.1.1. Доминирование по Менделю 31
2.1.2. Анализирующее скрещивание 33
2.1.3. Неполное доминирование и кодоминирование ... 33
2.1.4. Отклонения от ожидаемого расщепления 34
2.2. Дигибридное скрещивание 34
2.3. Генетический анализ при взаимодействии генов 35
2.3.1. Комплементарное действие генов 35
2.3.2. Эпистаз 37
2.3.3. Полимерия 37
2.4. Количественные признаки 38

Глава 3. **Морганизм — хромосомная теория наследственности** 40

3.1. Наследование признаков, сцепленных с полом 40
3.2. Нерасхождение половых хромосом 41
3.3. Сцепленное наследование и кроссинговер 42
3.3.1. Сцепленное наследование 42
3.3.2. Кроссинговер 43
3.3.2.1. Генетические доказательства перекреста хромосом 43
3.3.2.2. Цитологические доказательства кроссинговера 44
3.3.2.3. Частота кроссинговера и линейное расположение генов в хромосоме 45
3.3.2.4. Одинарный и множественный перекресты хромосом 46
3.3.2.5. Интерференция 47
3.3.2.6. Неравный кроссинговер 47
3.3.2.7. Митотический (соматический) кроссинговер 48
3.3.2.8. Факторы, влияющие на кроссинговер 48

Глава 4. **Изменчивость наследственного материала** 51

4.1. Мутационная теория и классификации мутаций 51
4.1.1. Закон гомологических рядов наследственной изменчивости Н. И. Вавилова 52
4.1.2. Классификация мутаций Г. Мёллера 53
4.1.3. Генеративные и соматические мутации 55
4.1.4. Прямые и обратные мутации 55
4.1.5. Плейотропный эффект мутаций 55
4.1.6. Экспрессивность и пенетрантность мутаций 55
4.1.7. Множественные аллели 56
4.1.8. Условные мутации 57
4.2. Спонтанные и индуцированные мутации 57
4.2.1. Методы учета мутаций 57
4.2.2. Спонтанные мутации 59
4.2.3. Индуцированные мутации 60
4.3. Хромосомные перестройки 64
4.3.1. Инверсии 64
4.3.2. Транслокации 66
4.3.3. Делеции 67
4.3.4. Дупликации 69
4.4. Полиплоидия 70
4.4.1. Автополиплоидия 71
4.4.2. Аллополиплоидия (амфиполиплоидия) 72
4.4.3. Искусственное получение полиплоидов 74
4.4.4. Анеуплоидия 74
4.4.5. Сегментальная анеуплоидия у дрозофилы 75
4.4.6. Гаплоидия 76
4.5. Системные мутации 77
4.6. Ненаследственная изменчивость 77
4.7. Близнецы 80

Глава 5. **Генетический анализ: картирование генов** 83

5.1. Цели и задачи генетического анализа 83
5.2. Получение мутаций 83
5.3. Тестирование мутаций на аллелизм 84
5.4. Межаллельная комплементация 84

5.5. Определение группы сцепления 86
5.5.1. Определение группы сцепления с помощью рецессивных маркеров 86
5.5.2. Определение группы сцепления с помощью доминантных маркеров 87
5.6. Локализация гена в группе сцепления 87
5.6.1. Классический метод 87
5.6.2. Картирование летальных мутаций 89
5.6.3. Селективные схемы скрещивания 89
5.6.4. Соотношение кроссоверной и молекулярной карт генов 90
5.6.5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек 91
5.6.6. Картирование генов с помощью соматического кроссинговера 91
5.7. Метод анеуплоидных тестеров 91
5.7.1. Нуллисомия 91
5.7.2. Моносомия 91
5.8. Методы клеточной биологии 92
5.9. Локализация генов с помощью гибридизации нуклеиновых кислот in situ 92
5.10. Генеалогический метод 94
5.11. Трансформация у бактерий 95
5.12. Трансдукция 99
5.13. Конъюгация 100

Глава 6. **Структура и организация генома** 107

6.1. Роль ДНК в наследственности 107
6.2. Структура ДНК 108
6.3. Репликация ДНК 110
6.3.1. Механизмы репликации 110
6.3.2. Особенности репликации ДНК у эукариот 117
6.4. Генетический код 123
6.5. Геномика — наука о геномах 127
6.6. Структура генома эукариот 129
6.7. Мобильные элементы генома 131
6.7.1. Открытие и классификация мобильных элементов 131
6.7.2. Мобильные элементы у дрозофилы 135
6.7.3. Ty-элементы у дрожжей 138
6.7.4. Транспозоны млекопитающих 138
6.7.5. Функциональное значение мобильных элементов 140
6.8. Мобильные элементы прокариот 142
6.8.1. IS-элементы 142
6.8.2. Транспозоны 142
6.8.3. IS-элементы и транспозоны в плазмидах 142
6.8.4. Бактериофаг Mu 145

Глава 7. **Структура гена** 146

7.1. Развитие представлений о гене 146
7.2. Оперонный принцип организации генов у прокариот 149
7.3. Химический синтез генов 152
7.4. Современные методы молекулярной генетики 152
7.4.1. Ферменты рестрикции 153
7.4.2. Векторы для молекулярного клонирования 154
7.4.2.1. Плазмидные векторы 154
7.4.2.2. Фаговые векторы 158
7.4.2.3. Космидные векторы 160
7.4.2.4. Челночные векторы 160
7.4.2.5. Искусственные хромосомы дрожжей (YAC) 160
7.4.3. Создание геномных библиотек 161
7.4.4. Построение рестрикционных карт 162
7.4.5. Саузерн-блот анализ 165
7.4.6. «Хромосомная ходьба» 166
7.4.7. Нозерн-блот анализ 167
7.4.8. Полимеразная цепная реакция 167
7.4.9. Определение последовательности нуклеотидов (секвенирование) 168
7.4.10. Трансформация у дрозофилы 169
7.5. Структура транскрипта: структурная и регуляторная части гена 172
7.6. Регуляторная часть гена 174
7.6.1. Промоторы и регуляторы 174
7.6.2. Метод репортерных генов для изучения регуляторных участков генов 181
7.6.3. Энхансерные участки гена 182
7.6.4. Инсуляторы 185
7.7. Структурная часть гена 187
7.7.1. Интроны и экзоны 187
7.7.2. Альтернативный сплайсинг 189
7.7.3. Процессинг геномной ДНК у ресничных инфузорий 191
7.7.4. Локализация генов в интронах 194
7.7.5. Изучение структурной части гена с помощью трансформации 194
7.7.6. Участки, терминирующие транскрипцию 195
7.8. Гомология генов 196
7.9. Псевдогены 196
7.10. Расположение генов в хромосомах эукариот 197
7.11. Биотехнологии манипуляций с генами 200
7.11.1. Стратегия генно-инженерных работ 200
7.11.1.1. Выделение ДНК нужного гена из генома 200
7.11.1.2. Перенос генов в клетки других организмов 202
7.11.2. Задачи и достижения биотехнологии 203
7.11.2.1. Биотехнология растений 203
7.11.2.2. Трансгенные животные 204
7.11.2.3. Биотехнология микроорганизмов 204
7.11.2.4. Генная терапия 204
7.11.2.5. Применение в криминалистике 204

Глава 8. **Молекулярные механизмы мутагенеза, репарации ДНК, кроссинговера и генной конверсии** 207

8.1. Характеристики мутаций 207
8.1.1. Мутации, связанные с нарушением генетического кода 207
8.1.2. Мутации, индуцируемые инсерциями мобильных элементов 210
8.1.3. Мутации, обусловленные экспансией тринуклеотидных повторов 210
8.1.4. Обратные и супрессорные мутации 211
8.1.5. Причины мутирования 213
8.2. Механизмы репарации ДНК 217
8.2.1. Прямая коррекция мутационных повреждений 217

8.2.2. Механизмы репарации, связанные с эксцизией пар оснований 218
8.3. Молекулярные основы кроссинговера 224
8.3.1. Гомологичная рекомбинация 226
8.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация 230
8.3.2.1. Характеристика процесса 230
8.3.2.2. Экспериментальная сайт-специфическая рекомбинация у дрозофилы 231
8.3.3. Случайная рекомбинация 233
8.4. Генная конверсия 234

Глава 9. **Строение и функционирование хромосом** 236

9.1. История вопроса 236
9.2. Хромосомы вирусов, прокариот и клеточных органелл эукариот 236
9.2.1. Геном бактерий 237
9.2.2. Геном митохондрий 238
9.2.3. Геном хлоропластов 241
9.3. Геном и хромосомы дрожжей 243
9.4. Митотические хромосомы высших эукариот 244
9.4.1. Идентификация хромосом 244
9.4.2. Кариотип и идиограмма 245
9.4.3. Дифференциальные окраски хромосом 246
9.4.4. «Правило Мёллера» и синтения 251
9.5. Эухроматин и гетерохроматин 254
9.5.1. Компактизация хроматина 254
9.5.2. Дифференциальная окрашиваемость 255
9.5.3. Конъюгация гетерохроматиновых районов 256
9.5.4. Контакты гетерохроматина с ядерной оболочкой 256
9.5.5. Гетерохроматин и хромосомные перестройки 256
9.5.6. Поздняя репликация 257
9.5.7. Варьирование количества гетерохроматина 258
9.5.8. Формирование гетерохроматиновых районов хромосом в онтогенезе 258
9.5.9. Повторенные последовательности 259
9.5.10. Генетическое содержание гетерохроматиновых районов хромосом 262
9.5.11. Интеркалярный гетерохроматин в пахитенных хромосомах кукурузы 266
9.6. Теломеры и теломерный гетерохроматин 269
9.6.1. Концепция теломеры 269
9.6.2. Строение теломер 271
9.7. Диминуция хроматина и хромосом 278
9.7.1. Диминуция хроматина у аскарид 278
9.7.2. Диминуция хроматина у циклопов 279
9.7.3. Элиминация хроматина у инфузорий 281
9.7.4. Элиминация хромосом у двукрылых насекомых 282
9.7.5. Физиологическое значение диминуции хроматина и хромосом 282
9.7.6. Реорганизация генома при полиплоидизации 283
9.8. Строение центромеры 285
9.9. В-хромосомы 288

Глава 10. **Эффекты положения гена** 289

10.1. Изменения активности гена в результате перемещений его в системе генома 289
10.2. Эффект положения мозаичного типа 290
10.2.1. Структура гена при эффекте положения мозаичного типа 290
10.2.2. Распространение инактивации 290
10.2.3. Типы мозаичности 291
10.2.4. Уровни инактивации гена 292
10.2.5. Модификаторы эффекта положения 293
10.2.6. Механизмы гетерохроматинизации 296
10.2.7. Эффект положения, вызываемый теломерным гетерохроматином 298
10.2.8. Эффект положения мозаичного типа у других организмов 298
10.3. Эффект Дубинина 299

Глава 11. **Упаковка ДНК в хромосомах** 302

11.1. Нуклеосомы 302
11.2. Наднуклеосомная укладка ДНК 308
11.3. Хромомерная организация хромосом 311

Глава 12. **Хромосомы типа «ламповых щеток»** 314

Глава 13. **Политенные хромосомы** 318

13.1. Общие положения 318
13.2. Морфология политенных хромосом 319
13.3. Встречаемость политенных хромосом в природе 321
13.4. Многонитчатость политенных хромосом 322
13.5. Синапсис и асинапсис гомологов 323
13.6. Хромомерный рисунок в политенных хромосомах 324
13.7. Политения как явление 326
13.8. Генетическая организация политенных хромосом 327
13.8.1. Диски 327
13.8.2. Междиски 329
13.8.3. Пуфы 330
13.9. Гормональный контроль пуфов 332
13.10. Пуфы теплового шока и синдром клеточного стресса 336
13.11. Кольца Бальбиани 340
13.12. Ядрышки 341
13.13. ДНК-пуфы 341
13.14. Прицентромерный гетерохроматин в политенных хромосомах 342
13.15. Интеркалярный гетерохроматин в политенных хромосомах 344
13.16. Использование политенных хромосом в генетическом анализе 348

Глава 14. **Генетика определения пола** 350

14.1. Общие принципы 350
14.2. Гинандроморфы, интерсексы, гермафродиты и другие половые отклонения 351

14.3. Балансовая теория определения пола у дрозофилы 353
14.4. Действие генов при определении пола у дрозофилы 354
14.5. Определение пола у млекопитающих 357
14.6. Определение пола у нематоды Caenorhabditis elegans 359
14.7. Компенсация дозы генов 359
14.7.1. Компенсация дозы генов у дрозофилы 359
14.7.2. Компенсация дозы генов у млекопитающих 363
14.7.3. Дозовая компенсация у Caenorhabditis elegans 366
14.7.4. Заключение 368

Глава 15. **Генетика развития** 369
15.1. Преформизм и эпигенетика 369
15.2. Роль клеточного ядра в развитии 370
15.3. Тотипотентность генома 371
15.4. Детерминация 374
15.5. Раннее эмбриональное развитие дрозофилы 375
15.6. Дифференциальная активность генов в ходе развития 384
15.7. Гомология генов, контролирующих раннее развитие 385
15.8. Апоптоз (генетически запрограммированная смерть клетки) 387

Глава 16. **Основы иммуногенетики** 390
16.1. Понятие об иммунитете 390
16.2. Некоторые отклонения в работе иммунной системы 398
16.2.1. Синдром приобретенного иммунодефицита — СПИД 398
16.2.2. Моноклональные антитела 398
16.2.3. Аутоиммунные заболевания 399

Глава 17. **Основы онкогенетики** 400
17.1. Трансформация клеток и процесс опухолеобразования 400
17.2. Причины возникновения опухолей 402
17.3. Онкогены 403
17.4. Антионкогены, или гены-супрессоры опухолей 408
17.5. Генетический контроль метастазирования 411
17.6. Многоступенчатость формирования опухоли (опухолевая прогрессия) 411

Глава 18. **Гены в популяциях** 413
18.1. Популяции и генофонд 413
18.2. Закон Харди–Вайнберга 413
18.3. Факторы генетической эволюции в популяциях 415

Глава 19. **Инбридинг и гетерозис** 420
19.1. Инбридинг 420
19.2. Гетерозис 424

Глава 20. **Основы молекулярной эволюционной генетики** 427

Глава 21. **Генетика поведения** 431
21.1. Генетика поведения дрозофилы 431
21.1.1. Гены зрительной системы 431
21.1.2. Функция обоняния 431
21.1.3. Гены, контролирующие способность к обучению 431
21.1.4. Брачное поведение 432
21.1.5. Гены, влияющие на биоритмы 434
21.2. Генетический контроль некоторых аспектов поведения у млекопитающих 435

Глава 22. **Генетический контроль формирования психологических характеристик человека** 437
22.1. Понятие о евгенике 437
22.2. Психологические характеристики человека 440
22.3. Интеллект и коэффициент умственного развития (I.Q.) 445
22.4. Сферы деятельности и социальное поведение 449
22.4.1. Склонности к профессиональной деятельности 449
22.4.2. Криминальное поведение 450
22.4.3. Предрасположенность к алкоголизму 451

Глава 23. **Нехромосомная наследственность** 452
23.1. Общие положения 452
23.2. Изучение митохондриальной ДНК у человека 454
23.2.1. Болезни человека, связанные с дефектами мтДНК 454
23.2.2. Использование полиморфизма митохондриальных ДНК в качестве молекулярных маркеров 455

Именной указатель 459
Предметный указатель 472

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Необходимость издания учебного пособия вызвана двумя обстоятельствами: прежде всего чрезвычайно бурным развитием генетики в мире, особенно молекулярной генетики и генной инженерии, а также тем, что последствия кризиса, охватившего Россию в 80–90-х гг., больнее всего ударили по науке и системе образования. В результате учебники по генетике для вузов не издавались с 1989 г. За это время наука ушла далеко вперед.

Данное пособие подготовлено на основе лекций по курсу «Общая генетика» (гл. 1–8 и 14–23), а также спецкурса «Материальные основы наследственности» (гл. 9–13), прочитанных студентам 3-го курса в Новосибирском государственном университете в 1992–2000 гг.

Весь материал легко подразделяется на шесть частей:

1) основные определения классической генетики (гл. 1–5);
2) структура генома и гена (гл. 6–7);
3) механизмы мутагенеза, репарации ДНК, кроссинговера и конверсии (гл. 8);
4) организация хромосом (гл. 9–13);
5) функционирование генетических систем (гл. 14–22);
6) нехромосомная наследственность (гл. 23).

Изложение материала не совсем традиционно. В данном пособии не приводится описание строения клетки, митоза и мейоза, поскольку эти сведения можно найти в многочисленных других руководствах.

К каждому самостоятельному разделу прилагается список литературы, использование которой может быть полезным.

В заключение автору хотелось бы выразить глубокую благодарность друзьям и коллегам, оказавшим помощь на различных этапах подготовки данного учебного пособия: А. П. Акифьеву и Е. С. Беляевой за прочтение текста, редакционную правку, советы и комментарии. При подготовке отдельных лекций большую помощь оказали А. А. Алексеенко, Л. В. Болдырева, В. А. Гвоздев, В. Геринг, Н. П. Гончаров, А. А. Горчаков, М. А. Грачев, О. В. Демакова, Р. Ч. Кинг, Е. Б. Кокоза, Т. Д. Колесникова, В. Г. Колпаков, Ю. М. Константинов, Л. И. Корочкин, Д. Е. Коряков, О. Э. Костерин, В. А. Лавровский, Ж.-А. Лепезант, Н. К. Назарова, Л. А. Першина, Д. Прескотт, В. А. Ратнер, Р. К. Саляев, В. А. Соколов, А. В. Таранин, В. Ф. Чугуй и М. Эшбернер.

За создание компьютерной версии, которая легла в основу настоящего пособия, автор благодарит Д. Е. Корякова, М. А. Шмакову, И. П. Селиванову, Е. А. Долбак, Е. А. Боровских.

При подготовке печатного издания были учтены пожелания и замечания Ю. П. Алтухова, В. А. Гвоздева, Г. П. Георгиева, С. Г. Инге-Вечтомова, Л. И. Корочкина, Е. Д. Свердлова, сделанные при ознакомлении с рукописью, за которые автор выражает глубокую благодарность. Особую признательность автор выражает редактору издательства Г. И. Сергеевой.

Создание данного учебного пособия частично было профинансировано Федеральной целевой программой «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1997–2000 гг.», программой «Соросовские профессора» Международного научного фонда.

Автор также благодарит Ю. С. Осипова, Н. Л. Добрецова, Г. П. Георгиева, Р. В. Петрова, В. К. Шумного, С. М. Закияна, Н. С. Диканского и Ю. А. Пака за большую организационную помощь в издании учебного пособия.

Замечания и пожелания можно отправлять автору по следующим адресам:

Институт цитологии и генетики СО РАН,
пр. Академика Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 333-12-78
E-mail: zhimulev@bionet.nsc.ru

ПРЕДИСЛОВИЕ К ЧЕТВЕРТОМУ ИЗДАНИЮ

Данная книга увидела свет в конце апреля 2002 года, однако уже к началу октября весь тираж оказался распроданным, и многие заявки остались неудовлетворенными. Это отражает ситуацию, сложившуюся в обществе с учебниками по генетике. Поэтому издательством с согласия автора было принято решение переиздать «Общую и молекулярную генетику» небольшим тиражом с исправлениями замеченных опечаток, мелких стилистических погрешностей и ошибок.

Автор считает свои приятным долгом выразить благодарность коллегам, принявшим участие в обсуждении первого издания и подготовившим замечания и рецензии: А. П. Акифьеву, Е. С. Беляевой, Н. Ш. Булатовой, С. Г. Васецкому, Г. П. Георгиеву, В. И. Глазко, Т. Т. Глазко, А. С. Графодатскому, С. М. Закияну, И. А. Захарову, В. И. Иванову, В. Г. Колпакову, Л. И. Корочкину, Б. А. Кузину, А. М. Оловникову, Т. А. Пшеничниковой, Р. К. Саляеву, В. В. Сорокину, С. В. Шеховцову и В. К. Шумному.

За помощь в подготовке доработанной рукописи и доиздании книги приношу глубокую благодарность Д. Е. Корякову, Е. А. Долбак, И. В. Лущикову, Г. И. Сергеевой, А. В. Тыщенко, Т. С. Швайковской и М. А. Шмаковой.

Издание частично поддержано грантами Министерства образования РФ PD02-1.4-74 и E02-6.0-37.

Замечания и пожелания по улучшению книги можно отправлять по следующим адресам:

Институт цитологии и генетики СО РАН,
пр. Академика Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 330-16-65
Телефоны: (383) 333-39-12, 330-16-65
E-mail: zhimulev@bionet.nsc.ru

Глава 1

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ: ПРЕДМЕТ И ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИКИ

1.1. ПРЕДМЕТ ГЕНЕТИКИ

По признанию многих современных биологов, генетика в последние годы стала сердцевиной всей биологической науки. Лишь в рамках генетики разнообразие жизненных форм и процессов может быть осмыслено как единое целое.

У кошки всегда рождается котенок, а у собаки — щенок. Это значит, что во время скрещивания передается, а в ходе развития реализуется информация о специфике строения клеток, тканей, органов, скелета, мышц и общего внешнего вида, физиологических и поведенческих реакций, а также всего остального, что и делает муху мухой, а гиппопотама — гиппопотамом.

В пределах одного организма идентичная во всех клетках генетическая информация развертывается с формированием настолько различных типов клеток или тканей, что трудно поверить в единство их происхождения. Нет ничего более различного, чем нервная клетка и фоточувствительная клетка омматидия, улавливающая свет, клетка мышечная или эпителиальная.

Таким образом, генетика — наука о наследственности и ее реализации в развитии, о закономерностях наследования генетически закрепленных признаков. Наследственность можно определить как биологический процесс, обусловливающий сходство между родителями и потомством. В понятие наследственности, по мнению М. Е. Лобашева, входят четыре группы явлений: организация генетического материала, его экспрессия, воспроизведение (репликация) и передача от одного поколения к другому. Следовательно, генетика объединяет эмбриологию и биологию развития, морфологию и физиологию в единую науку — биологию.

Несмотря на то что у собаки всегда рождается щенок, даже беглый взгляд на демонстрируемых участников выставки собак позволит увидеть огромное разнообразие их форм, мастей и размеров. Тем не менее все это — собаки. Изменчивость единого для любого конкретного вида генотипа является другой проблемой генетики.

Очень велико и практическое значение генетики, так как она служит теоретической основой селекции полезных микроорганизмов, культурных растений и домашних животных.

Из генетики выросли такие бурно развивающиеся науки, как биотехнология, генная инженерия, молекулярная биология. Трудно переоценить роль генетики в развитии медицины.

Рекомендуемые учебники и пособия

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3 т. М.: Мир, 1987–1988. Т. 1. 295 с. Т. 2. 368 с. Т. 3. 335 с.

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. 446 с.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. 698 с.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. 558 с.

Дубинин Н. П. Горизонты генетики. М.: Просвещение, 1970. 549 с.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. 487 с.

Дубинин Н. П. Генетика. Кишинев: Штиинца, 1985. 533 с.

Дубинин Н. П. Избранные труды: В 4 т. М.: Наука. Т. 1: Проблемы гена и эволюции. 2000. 545 с. Т. 2: Радиационный и химический мутагенез. 2000. 465 с.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. 592 с.

Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. Генетика: Энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогия, 1999. 447 с.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. 751 с.

Мюнтцинг А. Генетика. М.: Мир, 1967. 600 с.

Натали В. Ф. Основные вопросы генетики. М.: Просвещение, 1967. 207 с.

Основы цитогенетики человека / Под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской. М.: Медицина, 1969. 544 с.

Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. М.: Колос, 1967. 607 с.

Сэджер Р., Райн Ф. Цитогенетические и химические основы наследственности. М.: Мир, 1964. 463 с.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2 т. М.: Мир, 1998. Т. 1. 373 с. Т. 2. 391 с.

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1967. 461 с.
Уотсон Дж. Д. Двойная спираль: Воспоминания об открытии ДНК. М.: Мир, 1969. 152 с.
Чолаков В. Нобелевские премии. Ученые и открытия. М.: Мир, 1987. 368 с.
Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 421–432.
King R. C., Stansfield W. D. A dictionary of genetics. 5th ed. New York; Oxford: Oxford University Press, 1997. 439 p.
Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. 1272 p.
Lewin B. Genes VII. New York: Oxford University Press, 2000. 990 p.
Rieger R., Michaelis A., Green M. Glossary of genetics and cytogenetics. Jena: VEB Gustav Fisher Verlag, 1976. 647 p.
Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. 805 p.
Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S. General genetics. 2nd ed. San Francisco; London: W. H. Freeman and Company, 1965. 557 p.

1.2. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Фактически вплоть до начала XX в. гипотезы о механизмах наследственности имели умозрительный характер. Тем не менее они представляют интерес для любознательного читателя.

Первые идеи о механизмах наследственности высказывали древние греки, главным образом Гиппократ, уже в V в. до н. э. По его мнению, половые задатки (т. е. в нашем понимании яйцеклетки и сперматозоиды), участвующие в оплодотворении, формируются из клеток всех органов, в результате чего признаки родителей непосредственно передаются потомкам, причем здоровые органы поставляют здоровый репродуктивный материал, а нездоровые — нездоровый. Это теория прямого наследования признаков.

Аристотель (IV в. до н. э.) высказывал несколько иную точку зрения: он полагал, что половые задатки, участвующие в оплодотворении, производятся не напрямую из соответствующих органов, а из питательных веществ, необходимых для этих органов. Это теория непрямого наследования.

Много лет спустя, на рубеже XVIII—XIX вв., автор концепции эволюции Ж. Б. Ламарк использовал представления Гиппократа для построения своей теории передачи потомству новых признаков, приобретенных в течение жизни.

Теория пангенеза, выдвинутая Ч. Дарвином в 1868 г., также базируется на идее Гиппократа. По мнению Дарвина, от всех клеток организма отделяются мельчайшие частицы — «геммулы», которые, циркулируя с током крови по сосудистой системе организма, достигают половых клеток. После их слияния в ходе развития организма следующего поколения геммулы превращаются в клетки того типа, из которого произошли, со всеми особенностями, приобретенными в течение жизни родителей. Отражением представлений о передаче наследственности через кровь является существование во многих языках выражений: «голубая кровь», «аристократическая кровь», «полукровка» и т. д.

В 1871 г. английский врач Ф. Голтон (F. Galton), двоюродный брат Ч. Дарвина, опроверг своего великого родственника. Он переливал кровь черных кроликов белым, а затем скрещивал белых между собой. В трех поколениях он «не нашел ни малейшего следа какого-либо нарушения чистоты серебристо-белой породы». Эти данные показали, что по крайней мере в крови кроликов геммулы отсутствуют.

В 80-х гг. XIX в. с теорией пангенеза не согласился А. Вейсман (A. Weismann). Он предложил свою гипотезу, согласно которой в организме существуют два типа клеток: соматические и особая наследственная субстанция, названная им «зародышевой плазмой», которая в полном объеме присутствует только в половых клетках.

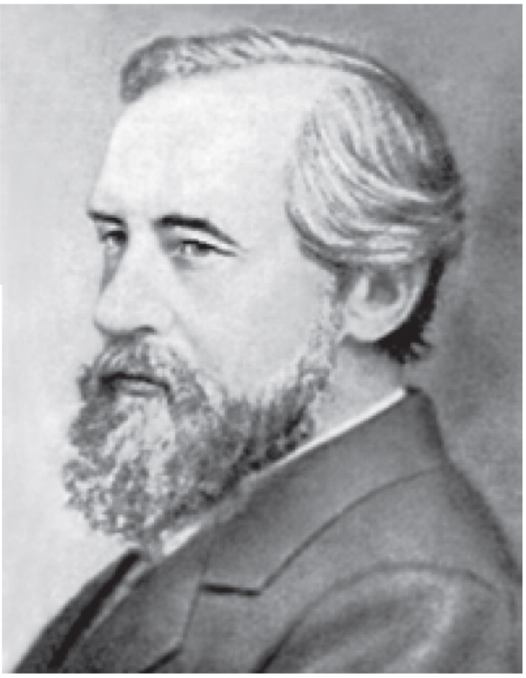
Подходы к современной генетике наметились в XVIII и особенно в XIX в. Растениеводы-практики, такие как О. Сажрэ и Ш. Нодэн во Франции, А. Гершнер в Германии, Т. Найт в Англии, обратили внимание на то, что в потомстве гибридов преобладают признаки одного из родителей. П. Люка во Франции сделал аналогичные наблюдения о наследовании различных признаков у человека.

Фактически всех их можно считать непосредственными предшественниками Г. Менделя. Однако только Мендель (рис. 1.1) сумел провести глубоко продуманные и спланированные эксперименты. Уже в первоначальной стадии работы он понял, что в эксперименте нужно выполнить два условия: растения должны обладать константно различающимися признаками и гибриды должны быть защищены от влияния чужой пыльцы. Таким условиям удов-

Рисунок 1.1

Грегор Иоганн Мендель
(1822–1884)

Рисунок 1.2



Гуго Мари де Фриз
(1848–1935)

летворял род *Pisum* (горох). Константность признаков была предварительно проверена в течение двух лет. Это были следующие признаки: «различия в длине и окраске стебля, в величине и форме листьев, в положении, окраске и величине цветков, в длине цветочных побегов, в окраске, форме и величине стручков (бобов), в форме и величине семян, в окраске семенной кожуры и белка» [Мендель, 1923. С. 8]. Некоторые из них оказались недостаточно контрастными, и дальнейшую работу он с ними не проводил. Осталось только 7 признаков. «Каждый из этих 7 признаков у гибрида или вполне тождественен с одним из двух отличительных признаков основных форм, так что другой ускользает от наблюдения, или же так похож на первый, что нельзя установить точного различия между ними». Признаки, «которые переходят в гибридные соединения совершенно неизменными... обозначены как доминирующие, а те, которые становятся при гибридизации латентными, как рецессивные». По наблюдениям Менделя, «совершенно независимо от того, принадлежит ли доминирующий признак семенному или пыльцевому растению, гибридная форма остается в обоих случаях той же самой» [Там же. С. 11].

Таким образом, заслугой Менделя является то, что из непрерывной характеристики растений он выделил дискретные признаки, выявил константность и контрастность их проявления, а также ввел понятие доминантности и рецессивности. Все эти приемы впоследствии вошли в гибридологический анализ любого организма.

В результате скрещивания растений, обладающих двумя парами контрастных признаков, Мендель обнаружил, что каждый из них наследуется независимо от другого. Признаки контрастны, не теряются при гибридизации и проявляются в последующих поколениях.

Эти краеугольные закономерности наследования признаков, названные через много лет «законами Менделя», неизменно проявляются у любых живых организмов, вступающих в скрещивание, а также у их потомства, т. е. у всего живого. Обнаруженные правила наследования легко описываются математическими символами и схемами, позволяющими задолго до появления потомков точно предсказывать его характеристики. В биологии, таким образом, впервые появилась наука, обладающая предсказательной силой. И тем не менее работа Менделя не заинтересовала современников (см. дополнение 1.1) и не повлияла на распространенные в конце XIX в. представления о наследственности.

Вторичное открытие законов Менделя в 1900 г. Г. де Фризом (H. de Vries) (рис. 1.2) в Голландии, К. Корренсом (C. Correns) в Германии и Э. Чермаком (E. Tschermak) в Австрии

Рисунок 1.3

Уильям Бэтсон
(1861–1926)

Рисунок 1.4

Вильгельм Людвиг Иогансен
(1857–1927)

подтвердило представление о существовании дискретных наследственных факторов. Мир уже был готов к восприятию новой науки, и началось ее триумфальное шествие. Справедливость законов Менделя о наследовании (менделировании) проверяли на все новых и новых растениях и животных и получали неизменные подтверждения. На основе исключений из правил быстро развивались новые положения общей теории наследственности. В 1906 г. англичанин У. Бэтсон (W. Bateson) (рис. 1.3) предложил термин «генетика» (от лат. «geneticos» — относящийся к происхождению, или «geneo» — порождаю, или «genos» — род, рождение, происхождение). В 1909 г. датчанин В. Иогансен (W. Johannsen) (рис. 1.4) предложил термины «ген», «генотип» и «фенотип».

Но уже вскоре после 1900 г. встал вопрос: что такое ген и где он в клетке расположен? Еще в конце XIX в. А. Вейсман (рис. 1.5) предположил, что постулированная им «зародышевая плазма» должна составлять материал хромосом. В 1903 г. немецкий биолог Т. Бовери (T. Boveri) и студент Колумбийского университета У. Сэттон (W. Sutton), работавший в лаборатории американского цитолога Э. Вильсона (E. Wilson), независимо друг от друга предположили, что общеизвестное поведение хромосом во время созревания половых клеток, а также при оплодотворении позволяет объяснить характер расщепления наследственных единиц, постулированный теорией Менделя, т. е., по их мнению, гены должны располагаться в хромосомах.

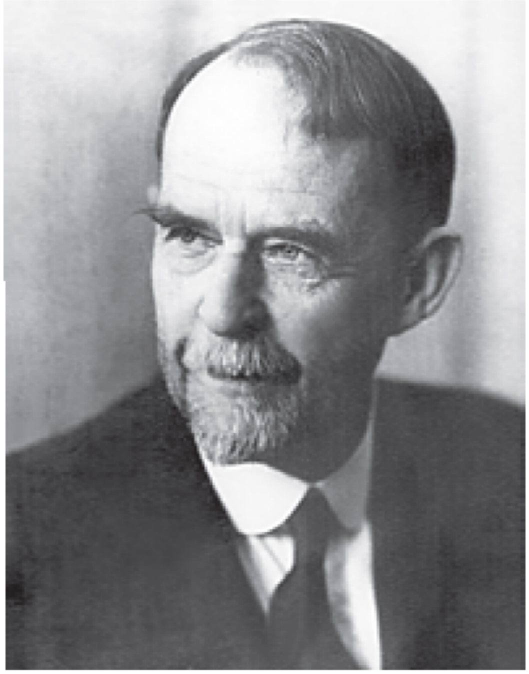
В 1906 г. английские генетики У. Бэтсон и Р. Пэннет (R. Punnett) в опытах с душистым горошком обнаружили явление сцепления наследственных признаков при передаче потомству, а другой английский генетик Л. Донкастер (L. Doncaster) тоже в 1906 г. в опытах с бабочкой крыжовниковой пяденицей открыл наследование, сцепленное с полом. На первый взгляд, и те, и другие данные явно не укладывались в менделевские законы наследования. Однако это противоречие легко устраняется, если представить, что происходит сцепление генов с материалом той или иной хромосомы.

С 1910 г. начинаются эксперименты группы Т. Моргана (T. Morgan) (рис. 1.6). Вместе со своими учениками А. Стёртевантом (A. Sturtevant) (рис. 1.7), К. Бриджесом (C. Bridges) (рис. 1.8) и Г. Мёллером (H. Muller) (рис. 1.9), ставшими также основоположниками современной генетики, он к середине 20-х гг. сформулировал хромосомную теорию наследственности, согласно которой гены расположены в хромосомах, как бусы на нити; были определены порядок расположения и даже относительные расстояния между генами. Именно Морган ввел в генетические исследования в ка-

Рисунок 1.5

Август Вейсман
(1834–1914)

Рисунок 1.6



Томас Хант Морган
(1866–1945)

честве объекта маленькую плодовую мушку дрозофилу — *Drosophila melanogaster*.

В 1929 г. А. С. Серебровский (рис. 1.10) и Н. П. Дубинин (см. рис. 1.26), еще не зная, что такое ген и из какого материала он состоит, на основании результатов собственных исследований пришли к выводу о его сложной организации и делимости.

В 1941 г. Дж. Бидл (G. Beadle) (рис. 1.11) и Э. Тейтум (E. Tatum) (рис. 1.12) сделали заключение о том, что всякий ген определяет синтез одного фермента. Они предложили формулу: «один ген — один фермент», позднее, после уточнения: «один ген — один белок» или «один ген — один полипептид».

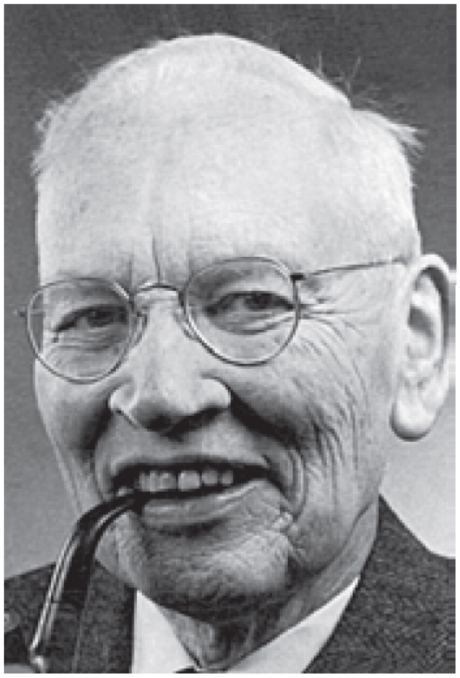
В 1925 г. Г. А. Надсон (рис. 1.13) совместно с Г. С. Филипповым в опытах с грибами *Mucor* доказали возможность искусственного получения мутаций под действием ионизирующего излучения. В 1927 г. возможность индукции мутации путем рентгеновского облучения была показана Г. Мёллером.

Уже в 30-х гг. ученых заинтересовал вопрос: из какого материала построены гены? В 1928, а в более развернутой форме в 1935 г. Н. К. Кольцов выдвинул гипотезы о молекулярной организации и матричного синтеза гена. Он исходил из того, что материал хромосомы должен тянуться от одного ее конца до другого. И таким материалом, по его мнению, должна быть молекула белка. Разметка молекулы на гены по этой модели также осуществляется легко: в белках всегда существуют радикалы, отличные один от другого, которые могут представлять гены. Изменения радикалов — «отрыв тех или иных атомов и замена их другими», по мнению автора, должны приводить к мутациям. Вместо случайной сборки генов в хромосому при ее удвоении он предложил фактически матричный принцип воспроизведения хромосом, сохраняющий порядок генов. Модель привлекла внимание. Идея хромосомы-молекулы произвела глубокое впечатление на генетиков, она объясняла многие явления, но оказалась неверной, поскольку, как позднее выяснилось, наследственным материалом является дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК.

В 1935 г. Н. В. Тимофеев-Ресовский, К. Циммер (K. Zimmer) и М. Дельбрюк (M. Delbrück) в статье «О природе генных мутаций и структуре гена», изданной в виде небольшой брошюры с зеленой обложкой и получившей название «Классическая зеленая тетрадь», впервые развили экспериментально обоснованную модель гена как макромолекулярной структуры — сегмента структуры более высокого порядка — хромосомы и даже рассчитали размер гена.

В 1944 г. вышла книга знаменитого физика-теоретика Э. Шрёдингера (E. Schrödinger) «Что такое жизнь? С точки зрения физика»,

Рисунок 1.7



Альфред Хенри Стёртевант
(1891–1970)

Рисунок 1.8

Кальвин Бриджес
(1889–1938)

в которой автор, базируясь на «Зеленой тетради», развил представление о гене-молекуле. По его мнению, «хромосомы… содержат в виде своего рода шифровального кода весь „план“ будущего индивидуума и его фукционирования в зрелом состоянии. Каждый полный набор хромосом содержит весь шифр… ». И в этой модели роль носителя наследственности также приписывается белку, ибо, как пишет автор, ДНК, или, как ее тогда называли, тимонуклеиновая кислота, является «сравнительно простым органическим соединением, которому было бы странно приписывать роль носителя наследственных свойств».

В 1944 г. в результате работ по трансформации у бактерий О. Эйвери (O. Avery), К. МакЛеод (C. McLeod) и М. МакКарти (M. McCarty) показали, что трансформирующим агентом у пневмококков является ДНК, а следовательно, именно этот компонент хромосом и является носителем наследственной информации. Несколько позже, в 1952 г., в экспериментах А. Херши (A. Hershey) и М. Чейз (M. Chase) было показано, что инфекционным элементом вирусов служит их нуклеиновая кислота. В этом же 1952 г. Н. Зиндер (N. Zinder) и Дж. Ледерберг (J. Lederberg) открыли у сальмонеллы явление трансдукции, т. е. переноса вирусами генов хозяина, еще раз показав роль ДНК в осуществлении наследственности.

Новый этап развития генетики начинается в 50-е гг. в результате коллективных усилий представителей многих наук: кроме генетиков, это физики, химики, математики и микробиологи. Особенно много сделали физики.

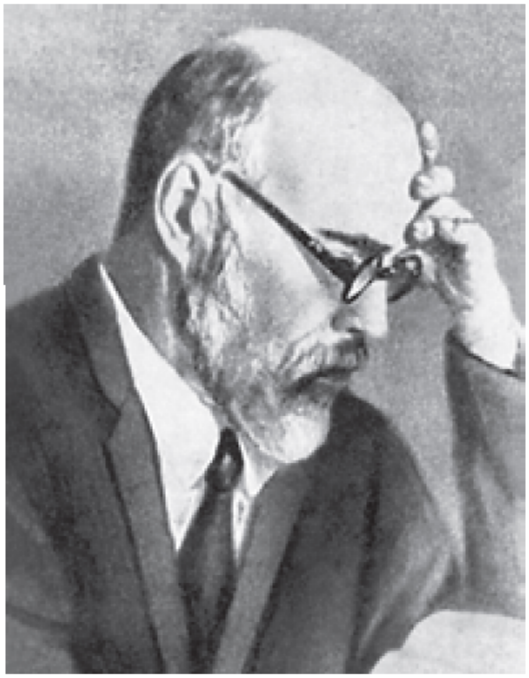
Результатом этого синтеза знаний стала расшифровка в 1953 г. структуры ДНК Дж. Уотсоном (J. Watson) и Ф. Криком (F. Crick), которые обобщили данные рентгеноструктурного анализа, полученные М. Уилкинсом (M. Wilkins) и Р. Франклин (R. Franklin). Модель признали быстро и повсеместно. Она, кроме того что объясняла все известные факты о молекулярной структуре ДНК, предлагала матричный принцип ее воспроизведения (репликации), открыла пути для понимания множества других фундаментальных механизмов генетических процессов. Именно время открытия Уотсона и Крика многими современными учеными считается датой рождения молекулярной биологии.

С конца 50-х — начала 60-х гг. начинается триумфальное шествие генетики, да и молекулярной биологии в целом, развитие которых, несомненно, было обусловлено расшифровкой структуры ДНК. Поток открытий просто огромен, а достижения в деле регулирования биологических процессов столь впечатляющи, что затмевают любые идеи писателей-фантастов. Есть возможность только вкратце упомянуть некоторые из этих открытий. В 1958 г. Ф. Крик

Рисунок 1.9

Герман Мёллер
(1890–1967)

Рисунок 1.10



Александр Сергеевич Серебровский
(1892–1948)

сформулировал принцип передачи генетической информации: ДНК→РНК→белок, который был им назван «центральной догмой молекулярной биологии». Следующим огромным успехом была расшифровка генетического кода. Собственно вопрос о том, как четыре различных нуклеотида в составе ДНК могут закодировать 20 аминокислот в составе полипептида, впервые в 1954 г. поставил физик-теоретик Г. А. Гамов, а экспериментально нашли ответ в 1961 г. биохимики М. Ниренберг (M. Nirenberg), Р. Холли (R. Holley), Г. Хорана (H. Khorana), а также Ф. Крик и С. Бреннер (S. Brenner) и их сотрудники.

На долгие годы захватили умы генетиков и близких к генетике биологов идеи французских ученых Ф. Жакоба (F. Jacob) и Ж. Моно (J. Monod), открывших в 1961 г. оперонный принцип организации генов и регуляции генной активности у бактерий. А в 1969 г. в США Г. Хорана с сотрудниками синтезировали химическим путем первый ген. Продолжая изучать строение гена, П. Робертс (P. Roberts) и Ф. Шарп (P. Sharp) установили, что гены состоят из многих частей, кодирующих — экзонов и некодирующих — интронов, и открыли явления сплайсинга в 1977 г. В том же году Дж. Уэбер (J. Weber), У. Джелинек (W. Jelinek) и Дж. Дарнелл (J. Darnell) открыли альтернативный сплайсинг.

Новая революция в генетике произошла в середине 70-х гг. Так же как и первая, в конце 40-х — начале 50-х, она была связана с новым синтезом знаний. Но на этот раз объединились знания, полученные генетиками разных направлений: молекулярной и биохимической генетики, генетики бактериофагов, бактерий и плазмид, генетики дрожжей, млекопитающих и дрозофилы.

Используя знания об организации наследственного аппарата различных модельных объектов, удалось разработать технологии манипуляций с генами, которые позже получили название генной инженерии.

В 1974 г. К. Маррей и Н. Маррей (K. Murray, N. Murray), манипулируя рестрикционными сайтами фага лямбда, создали хромосому, способную заключать в себя чужеродную ДНК. Таким образом фаг лямбда стал вектором для клонирования чужеродной ДНК, а у исследователей появилась неограниченная возможность переносить гены и фрагменты ДНК из одного организма в другой и размножать (клонировать) их.

В 1975 г. были предложены сразу три важнейших метода генной инженерии:

1. У. Бентон, Р. Дэйвис (W. Benton, R. Davis) разработали быстрый метод поиска бляшек с рекомбинантными лямбда-фагами, переноса их ДНК на нитроцеллюлозные фильтры и выявле-

Рисунок 1.11

Джордж Бидл
(1903–1989)

Рисунок 1.12

Эдвард Тейтум
(1909–1975)

ния рекомбинантных фагов для дальнейшего клонирования ДНК.

2. М. Гранштейн (M. Grunstein) и Д. Хогнесс (D. Hogness) предложили метод гибридизации с колониями бактерий, который позволил изолировать бактериальные клетки, несущие клонированные гены или фрагменты ДНК.

3. Е. Саузерн (E. Southern) описал метод переноса фрагментов ДНК с агарозных гелей на нитроцеллюлозные фильтры. Эти фильтры он затем гибридизовал с радиоактивной ДНК и гибриды выявлял методом авторадиографии. Этот метод получил название Саузерн-блот гибридизации. Метод позволяет определять представленность в геноме той или иной фракции ДНК, картировать положение генов и инсерций чужеродной ДНК, точек разрывов хромосомных перестроек и, в конечном счете, клонировать гены.

В 1978 г. группой Т. Маниатиса (T. Maniatis) созданы первые геномные библиотеки — наборы фрагментов ДНК, заключенные в тот или иной вектор (фаг или плазмиду) и в совокупности представляющие весь геном конкретного вида растений или животных. В 1979 г. В. Бендер (W. Bender), П. Спирер (P. Spierer) и Д. Хогнесс (D. Hogness) разработали метод «хромосомной ходьбы», позволивший клонировать протяженные (сотни тысяч пар нуклеотидов) фрагменты ДНК. К настоящему времени с помощью этого метода уже клонированы тысячи генов. Несколько позже, в 1985 г., Р. Саики (R. Saiki) и К. Мюллис (K. Mullis) предложили другой подход к клонированию — метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий синтезировать необходимые фрагменты ДНК и затем многократно увеличивать число их копий. Этот метод позволяет из незначительных количеств ДНК, сравнимых с содержанием ее в одном ядре или даже в одном гене, нарабатывать количества, необходимые для биохимического анализа. Метод уже очень широко используется, и не только в молекулярной биологии, но и в истории, этнографии и криминалистике. Так, используя ничтожные количества ДНК, содержащиеся на саркофагах и покрывалах мумий или костях предков человека, оказалось возможным наработать объемы ДНК, после анализа которых были сделаны интересные выводы о формировании, эволюции и миграциях предков современных людей. Собирая следы ДНК на уликах и используя метод ПЦР, раскрывают различные преступления. Применение этого метода оказалось решающим при идентификации останков семьи последнего российского императора Николая II.

В конце 70-х гг. получила завершение история открытия мобильных элементов генома (МЭГ) — обязательных непостоянно локализу-

Рисунок 1.13

Георгий Адамович Надсон
(1867–1939)

ющихся компонентов любого генома. В конце 40-х гг. Б. МакКлинток (B. McClintock) открыла систему мобильных элементов *Ac-Ds* у кукурузы и установила закономерности их перемещений. В 1976 г. ДНК мобильных элементов у дрозофилы была выделена и клонирована группами Г. П. Георгиева и В. А. Гвоздева в России и Д. Хогнесса в США. Кроме теоретических знаний о существовании столь специфической фракции генома, понимание механизмов перемещения МЭГ оказалось решающим в создании метода трансформации у эукариот.

С концом 70-х гг. ассоциируется время, когда создавались предпосылки осуществления грандиозных геномных проектов. Так сейчас называют систему манипуляций, имеющих целью клонирование всей геномной ДНК того или иного вида с последующим прочтением (секвенированием) всех последовательностей нуклеотидов. В 1977 г. Ф. Сэнгер (F. Sanger) и 8 его коллег сообщили о полном прочтении последовательностей нуклеотидов в ДНК фага ϕX174 в результате применения разработанного ими метода секвенирования. В том же году А. Максам (A. Maxam) и У. Гилберт (W. Gilbert) предложили другой метод определения последовательностей нуклеотидов.

Используя эти методы, в 90-х гг. большие группы ученых секвенируют геномы уже более чем 50 видов. В 1992 г. консорциум ученых (146 человек из 35 европейских лабораторий) сообщил о секвенировании последовательностей нуклеотидов в 3-й хромосоме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

В 1995 г. две группы заявили о расшифровке геномов первых бактерий — *Haemophilus influenza* и *Mycoplasma genitalium*. В 1997 г. были просеквенированы геном бактерии *Escherichia coli* (Ф. Блаттнер (F. Blattner) и др.) и полностью — геном дрожжей *S. cerevisiae* (Р. Клэйтон (R. Clayton) и др.), в феврале 1999 г. — геном нематоды *Caenorhabditis elegans* (Р. Уилсон (R. Wilson) и др.). В марте 2000 г. группа из 200 ученых (М. Адамс (M. Adams) и др.) сообщила о расшифровке генома дрозофилы. Весной 2000 г. английские ученые из Кембриджа заявили, что в основном секвенировали геном человека. В начале 2001 г. геном человека был расшифрован большой группой ученых из фирмы Celera Genomics.

После того как было открыто явление переноса генетической информации (трансформации) у прокариот, постоянно предпринимались попытки осуществить такой перенос у эукариот. В 1980 г. первые трансгенные мыши были получены инъекцией клонированной ДНК в пронуклеус оплодотворенного яйца (Дж. Гордон (J. Gordon) и др.). В том же году была предложена методика эффективной трансформации культивируемых клеток млекопитающих микроинъекцией ДНК непосредственно в ядро. Использование мобильных элементов генома, главным образом их способности перемещаться по геному, привело к развитию методики трансформации у дрозофилы. В 1982 г. А. Спрадлинг (A. Spradling) и Дж. Рубин (G. Rubin) встроили в мобильный *P*-элемент нормальный ген дрозофилы и затем ввели этот элемент в эмбрион, гомозиготный по мутации данного гена. В результате этой искусственной операции произошло восстановление нормального фенотипа. С тех пор в экспериментах с дрозофилой проведены десятки тысяч трансформаций. Сбываются мечты человека о возможности исправления наследственности. Опыты по трансформации, хотя и проведенные на модельном объекте — дрозофиле, вселяют уверенность в этом. Разработка метода трансформации оказала колоссальное влияние на всю экспериментальную генетику, а некоторые опыты дрозофилистов просто будоражат воображение. В 1995 г. швейцарский ученый из Базеля В. Геринг (W. Gehring) осуществил удивительную трансформацию, введя дрозофилам, мутантным по формированию глаз, гибридную молекулу ДНК, которая содержала ген, контролирующий развитие глаза у мыши и находив-

Дополнение 1.1

Грегор Иоганн Мендель был настоятелем католического монастыря в г. Брно (Чехия). Свою знаменитую работу «Опыты над растительными гибридами» он опубликовал в 1866 г. в журнале «Труды Брюннского общества испытателей природы» после докладов на заседаниях Общества 8 февраля и 8 марта 1865 г. (рис. 1.14). Не вызывает сомнения, что эта работа заложила начало новой науки. С тех пор вокруг этой статьи ведутся дискуссии. Обсуждаемые вопросы следующие:

1. Осталась ли работа не замеченной современниками и неизвестной вплоть до 1900 г.?
2. Читали ли работу Менделя ученые, переоткрывшие его законы, до начала собственных экспериментов?
3. Понимал ли сам Мендель то, что он открыл?
4. Не слишком ли хорошо результаты экспериментов Менделя удовлетворяют теоретически ожидаемым?
5. Есть ли в работе Менделя собственно формулировки законов или же присутствует лишь добросовестное описание полученных им эмпирических результатов?

1. Обычно считается, что работа Менделя не была известна современникам, так как нигде не обсуждалась с 1866 по 1900 г. Известно, однако, что Брюннское общество испытателей природы обменивалось своими изданиями со 133 научными обществами и академиями Европы и Америки. Кроме того, Мендель получил из журнала 40 оттисков, которые разослал биологам, которым это могло быть интересно. Однако и это не помогло. Как вспоминал Ф. Г. Добржанский в 1964 г., в середине XX в. один из крупных ботаников, разбирая библиотеку отца, тоже крупного ботаника, нашел оттиск статьи Менделя. Его страницы не были даже разрезаны. Еще один оттиск с сопровождающим письмом был послан другому крупному биологу, К. Нэгели (K. Nägele), который сам занимался гибридизацией растений. В слегка нравоучительной манере Нэгели объяснил Менделю, что его результаты — это только начало работы, что их нужно проверить на других видах.

В 1867 г. в основном ботаническом журнале того времени — «Flora» — в перечне наиболее важных работ по ботанике приведены полные библиографические данные статьи Менделя. Эта библиографическая справка в журнале «Flora» вызвала значительный интерес у читателей и повышенный спрос на том «Трудов Брюннского общества испытателей природы», в котором была статья Г. Менделя.

Обнаружена ссылка на работу Г. Менделя в библиографическом обзоре, опубликованном в журнале «Flora» в 1872 г. (A. Besnard). В справочнике ботанической литературы (B. Jackson, 1881) содержится 13 ссылок на различные работы по гибридизации, в том числе на работу Г. Менделя.

Из личной переписки Г. Менделя и проф. К. Нэгели (апрель 1867 г.) стало известно, что после доклада Г. Менделя возникла дискуссия, во время которой мнения слушателей разделились. Эта дискуссия была отражена в местных газетах.

В целом за период с 1865 по 1900 г. работы Менделя цитировали в научной литературе не менее 11–12 раз. Все это говорит о том, что работа Менделя не была неизвестной или тем более забытой [см.: Weiling, 1969; Weinstein, 1977; Monaghan, Corcos, 1987].

2. В современной литературе высказывается все больше сомнений в том, что переоткрыватели законов Менделя не читали его работу до начала своих экспериментов [Corcos, Monaghan, 1987a,b,c; Monaghan, Corcos, 1987].

3. Довольно многие из историков, не находя четких формулировок законов непосредственно в статье Менделя, приходят к выводу, что Мендель не осознавал до конца глубины написанного им. Однако это не так. В письме проф. Муру (Moore) Мендель описывает результаты своих опытов с горохом и сообщает об открытии им двух основных принципов наследования: закона расщепления и закона независимого распределения единиц наследования, названных в письме «элементами» [Mendel, 1986].

4. В 1936 г. Р. Фишер опубликовал работу, в которой подверг сомнению результаты уже собственно экспериментов Г. Менделя, полагая, что полу-

шийся под контролем усилителя транскрипции (энхансера) из генома дрожжей. Система сработала, и у мух сформировались глаза, причем не только в нормальном месте их нахождения: до 30 маленьких глаз появилось на разных органах мухи.

Особую известность у общественности получили эксперименты по так называемому клонированию животных. В начале 40-х гг. Г. В. Лопашов осуществил первые пересадки ядер из некоторых клеток тритона в безъядерные фрагменты цитоплазмы яиц на стадии 1–2 бластомеров. Однако эта работа не была продолжена сначала из-за войны, а затем из-за полного запрета генетики в России. В 1962 г. английский ученый Дж. Гёрдон (J. Gurdon), поставив задачу выяснить, сохраняется ли в дифференцированных клетках тот же самый набор генов, который имеет зигота, осуществил пересадку ядра из клетки кишечника головастика в яйцо лягушки, из которого было удалено собственное ядро. В результате из такой гибридной яйцеклетки развилась нормальная лягушка. Это свидетельствовало о том, что ядра соматических и половых клеток качественно идентичны. А раз так, то в результате каждой транс-

ченные данные «слишком близки к идеальным соотношениям» (например, при изучении обратных скрещиваний частоты фенотипов практически не отличались от 1 : 1) и противоречат закономерностям нормального распределения. Фишер фактически обвинил Менделя в том, что последний, заранее зная исследуемую закономерность, умышленно или неумышленно, но «подогнал» экспериментальные данные. В настоящее время некоторые генетики разделяют точку зрения Фишера. По мнению других, главная ошибка Фишера — в неверном использовании математического аппарата *post factum* [Pilgrim, 1984].

5. В работе Менделя действительно нет формулировок и названий того, что было названо 1-м и 2-м законами Менделя. Эти формулировки были даны авторами, переоткрывшими их [Monaghan, Corcos, 1984].

Один из крупнейших генетиков современности Ф. Г. Добржанский считает, что «Мендель был одной из наиболее трагических фигур в истории науки. Он должен был чувствовать, что его работа не признана и закончилась провалом. Едва ли он мог предвидеть, что через 16 лет после его смерти его работу переоткроют, а в конце следующего столетия основанная им наука станет одной из центральных в биологии. Пока же, при жизни, Мендель стал подтверждать справедливость своих законов на других видах, в частности, предложенных К. Нэгели ястребинках (*Hieracium*). Что и оказалось для него катастрофой. В то время никто не знал, что у этих растений нарушен половой процесс и они дают семена без него. Поэтому никаких результатов на этих видах Мендель получить не мог» [Dobzhansky, 1964. P. 1].

Подводя краткие итоги, можно заключить, что дело не в трудности восприятия работ Менделя или их неизвестности. Просто биологи в 1865 г. были значительно менее подготовлены к тому, чтобы осознать открытие Менделя, чем биологи в 1900 г. Эти знания еще не были востребованы ни обществом, ни наукой.

Рисунок 1.14

Обложка журнала «Труды Брюннского общества испытателей природы»

плантации ядра можно получать новое животное, а трансплантации многих ядер, полученных из одного животного, дают много животных, т. е. их клоны. В 1997 г. группой ученых из Шотландии во главе с Я. Вилмутом (I. Wilmut) с помощью методики ядерных трансплантаций была получена овца, всемирно известная Долли, в 1999 г. ученые из США клонировали мышь и корову, а в марте 2000 г. на свет появились сразу пять клонированных поросят. По мнению авторов этой работы, человека можно будет клонировать к 2005 г. Решение этой проблемы чисто технически зависит от генетиков, и она, без всякого сомнения, может быть решена, если человечество сочтет это необходимым.

Таким образом, за один век, если считать от момента осознания законов Менделя в 1900 г., генетика прошла путь от развития представлений о дискретности наследственности до фактического создания новых живых организмов методами генетических манипуляций по воле человека.

Литература к разделу 1.2

Володин Б. Мендель. М.: Мол. гвардия, 1968. 256 с. (Жизнь замечательных людей).

Гайсинович А. Е. Зарождение генетики. М.: Наука, 1967. 195 с.

Гайсинович А. Е. Зарождение и развитие генетики. М.: Наука, 1988. 423 с.

Гершкович И. Генетика. М.: Мир, 1968. 698 с. [Нобелевские лекции генетиков] Т. Морган: с. 559. Г. Мёллер: с. 562. М. Уилкинс: с. 576. А. Корнберг: с. 591. Дж. Бидл: с. 602. Э. Тэйтум: с. 611. Дж. Ледерберг: с. 619. Дж. Уотсон: с. 635. Ф. Крик: с. 653. Ф. Жакоб: с. 660.

Дубинин Н. П. Горизонты генетики. М.: Просвещение, 1970. С. 3–87.

Корренс К. О жизни и работе Грегора Менделя // Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.; Петроград: Госиздат, 1923. С. 52–64.

Мендель Г. Часть письма К. Негели // Гершкович И. Генетика. М.: Мир, 1968. С. 554–558.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.; Петроград: Госиздат, 1923. 71 с.

Ратнер В. А. Хроника великого открытия: идеи и лица // Природа. 1998. N 4. С. 68–79. № 11. С. 18–28.

Уотсон Дж. Д. Двойная спираль: Воспоминания об открытии ДНК. М.: Мир, 1969. 152 с.

Allen G. E. Thomas Hunt Morgan: the man and his science. Princeton: Princeton University Press, 1978. 350 p.

Corcos A. F., Monaghan F. V. Role of de Vries in the rediscovery of Mendel's paper. II. Did de Vries really understand Mendel's paper // J. Hered. 1987a. Vol. 78. P. 275–276.

Corcos A. F., Monaghan F. V. Correns, an independent discoverer of mendelism? I. An historical/critical note // J. Hered. 1987b. Vol. 78. P. 330.

Corcos A. F., Monaghan F. V. Correns, an independent discoverer of mendelism? II. Was Correns a real interpreter of Mendel's paper // J. Hered. 1987c. Vol. 78. P. 404–405.

Crow J. F. Some reflections on H. J. Muller // Environ. Mutagenes. 1987. Vol. 9. P. 349–353.

Dobzhansky T. The Mendel centennial // The Rockefeller Institute Review. 1964. Vol. 2. P. 1–6.

Falk R. The gene in search of an identity // Hum. Genet. 1984. Vol. 68. P. 195–204.

Federoff N. V. Barbara McClintock (June 16, 1902 — September 2, 1992) // Genetics. 1994. Vol. 136. P. 1–10.

Kohler R. E. Lords of the fly. *Drosophila* genetics and the experimental life. Chicago; London: University of Chicago Press, 1994. 321 p.

Lewis E. B. Remembering Sturtevant // Genetics. 1995. Vol. 141. P. 1227–1230.

Mendel G. Experiments in a monastery garden // Am. Zool. 1986. Vol. 26. P. 749–752.

Monaghan F. V., Corcos A. F. The true Mendelian laws // J. Hered. 1984. Vol. 75. P. 321–323.

Monaghan F. V., Corcos A. F. Mendel, the empiricist // J. Hered. 1985. Vol. 76. P. 49–54.

Monaghan F. V., Corcos A. F. Reexamination of the late of Mendel's paper // J. Hered. 1987a. Vol. 78. P. 116–118.

Monaghan F. V., Corcos A. F. Tschermak is non-discoverer of Mendelism. II. A critique // J. Hered. 1987b. Vol. 78. P. 208–210.

Pilgrim I. The too-good-to-be-true paradox and Gregor Mendel // J. Hered. 1984. Vol. 75. P. 501–502.

Sandler I., Sandler L. On the origin of mendelian genetics // Am. Zool. 1986. Vol. 26. P. 753–768.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine. Stockholm: Tryckeri AB Bjorkmans Eftr, Kungl Hovboktryckare, 1996.

Weiling F. Uber weitere unbekannte Hinweise auf J. G. Mendels «Versuche uber Planzen-Hybriden», u. a. aus dem Jahre 1867 // Sudhoffs Arch. 1969. Bd 53. S. 77–85.

Weinstein A. How unknown was Mendel's paper? // J. Hist. Biol. 1977. Vol. 10. P. 341–364.

1.3. КРАТКИЙ ОЧЕРК ИСТОРИИ ГЕНЕТИКИ В РОССИИ

В СССР золотой век генетики начался вскоре после Октябрьской революции 1917 г. В середине тридцатых годов, по мнению многих современных ученых, советская генетика, несомненно, стояла на втором, после США, месте в мире.

Наиболее крупной фигурой российской генетики был и надолго останется Н. И. Вавилов (рис. 1.15), открывший параллелизм наследственной изменчивости у растений (1922) и центры происхождения культурных растений (1927) [см.: Классики советской генетики. С. 9, 51]. Заслуги Вавилова еще при жизни были оценены современниками. Его имя было занесено на обложку основного в то время генетического журнала «Heredity» вместе с именами других крупнейших генетиков мира (рис. 1.16).

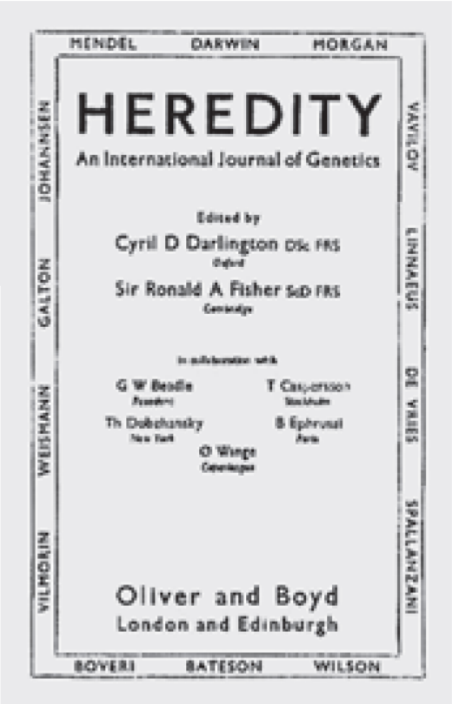
В 1911–1912 гг. С. Г. Навашин описал основные типы митотических хромосом растений: метацентрических, субметацентрических, акроцентрических, спутничных. Это описание легло в основу современной классификации морфологии хромосом.

Н. К. Кольцов (рис. 1.17), глава московской школы генетиков, высказал в 1928–1935 гг. гипотезу о хромосоме — гигантской молекуле,

Рисунок 1.15

Николай Иванович Вавилов
(1887–1943)

Рисунок 1.16



Обложка журнала «Heredity»

Рисунок 1.17

Николай Константинович Кольцов (1872–1940)

в которой гены представлены ее отдельными радикалами, и о матричном принципе репродукции гена. В 1934 г. он предположил, что гигантские хромосомы слюнных желез являются многонитчатыми.

А. С. Серебровский и Н. П. Дубинин в 1929 г. впервые продемонстрировали сложную природу организации гена.

С. С. Четвериков (рис. 1.18) в 1926 г. заложил основы экспериментальной генетики популяций.

А. С. Серебровский в 1940 г. предложил уникальный биологический метод борьбы с вредителями сельского хозяйства, основанный на применении транслокаций.

Ю. А. Филипченко (рис. 1.19) за свою короткую жизнь сделал выдающийся вклад в генетику растений и домашних животных.

Г. Д. Карпеченко (рис. 1.20) впервые получил межродовые гибриды растений.

Г. А. Левитский (рис. 1.21) был выдающимся цитогенетиком. В 1924 г. он предложил понятие кариотипа и в 1931 г. детально развил представления о нем.

Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов впервые в 1925 г. индуцировали мутации с помощью рентгеновских лучей у грибов *Mucor*.

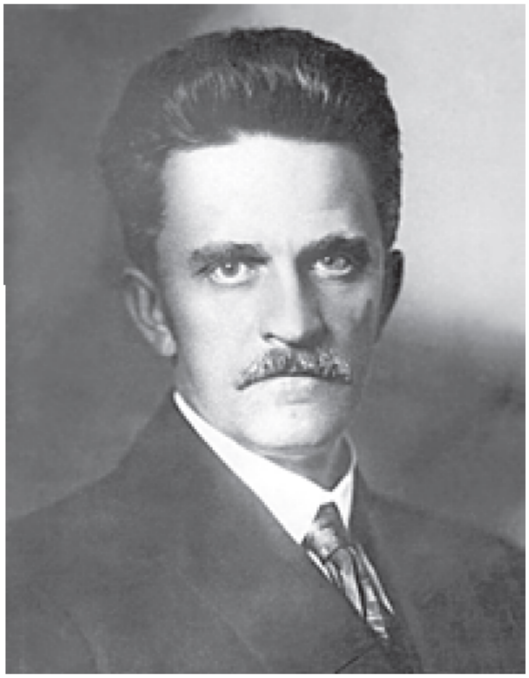
В 1934 г. Н. П. Дубинин и Б. Н. Сидоров открыли особый тип эффекта положения, названный впоследствии эффектом Дубинина. Можно привести огромный список фамилий выдающихся ученых мирового уровня: Б. Л. Астауров (рис. 1.22), И. А. Рапопорт, А. А. Прокофьева-Бельговская (рис. 1.23), М. Л. Бельговский, П. Ф. Рокицкий, Н. В. Тимофеев-Ресовский (рис. 1.24), Ф. Г. Добржанский (рис. 1.25), Б. Эфрусси, М. Е. Лобашев, В. В. Сахаров. Многие выдающиеся зарубежные ученые работали в российских лабораториях того времени: У. Бэтсон, С. Харланд и С. Дарлингтон из Англии, Э. Баур и Р. Гольдшмидт из Германии, К. Бриджес, Л. Дэнн и Г. Мёллер из США, Д. Костов из Болгарии.

Ситуация стала ухудшаться в конце 20-х гг., когда некоторые неоламаркисты стали активно защищать теорию наследования приобретенных в ходе жизни свойств организма [см: Gershenson, 1990]. Эти неоламаркисты получили существенную помощь от группы философов-марксистов, таких как М. Б. Митин и П. Ф. Юдин, заявивших, что теория Ламарка соответствует основным постулатам диалектического материализма. Их оппоненты обвинялись в «идеализме» в том смысле, что они отрицают возможность влияния внешней среды на наследственность. Правительство сильно поддерживало ламаркистов, даже пригласило известного австрийского ламаркиста П. Камерера занять высокий пост в советской биологической науке. Многие генетики опровергали данные П. Ка-

Рисунок 1.18

Сергей Сергеевич Четвериков
(1880–1959)

Рисунок 1.19



Юрий Александрович Филипченко
(1882–1930)

мерера (Н. К. Кольцов, А. С. Серебровский, Ю. А. Филипченко, М. Л. Левин, С. Г. Левит, С. С. Четвериков).

В свою очередь правительство критиковало этих ученых. В 1929 г., после самоубийства П. Камерера, узнавшего о разоблачении его научной подделки, С. С. Четвериков и его аспирант П. Ф. Рокицкий были арестованы. Четвериков был сослан на Урал, затем смог переехать во Владимир, потом в Горький (Нижний Новгород), но в Москву путь ему был закрыт.

В середине 30-х гг. дискуссии вновь возобновились, но уже с участием быстро набирающего силу Т. Д. Лысенко. Суть его воззрений сводилась к следующему.

Во-первых, он отрицал существование генов, объявляя их выдумкой буржуазных идеалистических ученых. Хромосомы, по его мнению, не имели никакого отношения к наследственности. Он отрицал законы Менделя, считая их «выдумкой католического монаха».

Во-вторых, Лысенко безусловно принимал идею наследования приобретенных признаков и отрицал роль отбора в эволюции, который считал «ошибкой Дарвина».

В-третьих, Лысенко полагал, что один вид внезапно, в результате скачка, может превратиться в другой, например, береза — в ольху, овес — в пшеницу, кукушка — в пеночку.

Лысенко никогда не проверял свои идеи ни экспериментально, ни сравнивая с литературными данными. Он заявлял, что источником его знаний являются работы И. В. Мичурина и К. А. Тимирязева, а также «классиков марксизма». На основе этих «знаний» он предлагал рецепты быстрого улучшения сельского хозяйства в целом, быстрого выведения ценных сортов растений — в 2–3 года, в то время как методы, базирующиеся на основе законов Вейсмана—Менделя—Моргана, требуют 10–15 лет работы.

Сталин поддержал Лысенко. Началось быстрое продвижение последнего по карьерной лестнице: в 1934 г. — академик АН Украины, в 1935 — академик ВАСХНИЛ, в 1938 — президент этой Академии, в 1939 г. — академик АН СССР. После ареста Н. И. Вавилова в 1940 г. Лысенко стал директором Института генетики АН СССР. С 1937 по 1966 г. Лысенко — депутат Верховного Совета СССР и заместитель его председателя. Он — лауреат Государственной премии и не менее 8 раз кавалер ордена Ленина, в 1945 г. стал Героем Социалистического Труда.

Правой рукой Лысенко был И. И. Презент, бывший адвокат. Он давал «идеологически выверенные» объяснения биологических теорий Лысенко.

Рисунок 1.20

Георгий Дмитриевич Карпеченко
(1899–1941)

Рисунок 1.21

Григорий Андреевич Левитский
(1878–1942)

В конце 1936 и в 1939 г. состоялись публичные дискуссии, организованные философом М. Б. Митиным — редактором журнала «Под знаменем марксизма». Сторону генетиков поддерживали будущий нобелевский лауреат Г. Мёллер, а также А. Р. Жебрак, Н. И. Вавилов и Н. П. Дубинин. Однако уже на этом этапе научная сторона дискуссий не интересовала ни лысенковцев, ни поддерживавших их правителей СССР. Вскоре после последней дискуссии (в 1940 г.) Вавилов был арестован и погиб в тюрьме Саратова от истощения. Место его могилы неизвестно до сих пор.

В 1939 г. в «Правде» появилась злобная статья против Н. К. Кольцова. Затем в возглавляемый им Институт экспериментальной биологии (ныне Институт биологии развития РАН им. Н. К. Кольцова) была направлена комиссия, включающая Лысенко. На основании заключения комиссии Кольцов был снят с должности директора. Через несколько месяцев он умер от инфаркта миокарда. После ареста Вавилова прошла волна арестов среди других генетиков. В камерах пыток погибли Г. А. Левитский в возрасте 64 лет, Г. Д. Карпеченко в возрасте 42 лет, Г. К. Мейстер, а также Н. К. Беляев, С. Г. Левит, И. И. Агол, М. Л. Левин и многие другие.

В 1948 г. состоялась печально знаменитая августовская сессия ВАСХНИЛ, которая стала апофеозом могущества Лысенко [О положении в биологической науке, 1948]. Вся процедура этого заседания была фарсом, специально подготовленным для расправы над генетикой. Заслуживают восхищения те немногие из генетиков, которые, зная, что это фарс, пришли на сессию и сказали свои последние слова в защиту генетики. Вот их имена:

И. А. Рапопорт	П. М. Жуковский
М. М. Завадовский	И. И. Шмальгаузен
С. И. Алиханян	А. Р. Жебрак
И. А. Поляков	В. С. Немчинов

Часть из них не выдержала, и к концу сессии они сломались, отступились от генетики, видимо, после того, как Лысенко заявил, что тов. Сталин прочитал и полностью одобрил его доклад о разгроме генетики. Все они потеряли работу.

Сразу после сессии ВАСХНИЛ в августе 1948 г. были составлены списки, по которым множество ученых-генетиков были уволены из вузов и академических институтов. Из журналов вырывали страницы, где были статьи генетиков, в статьях вымарывали слова «ген», «генетика», «хромосома». Многие ученые были отправлены в ссылку.

Некоторым, например Н. П. Дубинину, М. Е. Лобашеву, А. А. Прокофьевой-Бельговской, удалось выстоять, не отказываясь от сво-

Рисунок 1.22

Борис Львович Астауров
(1904–1974)

Рисунок 1.23

Александра Алексеевна Прокофьева-Бельговская
(1903–1984)

их убеждений, благодаря смене специальности. Дубинин несколько лет работал орнитологом, Лобашев — физиологом, Прокофьева-Бельговская — микробиологом, Рапопорт — палеонтологом, а З. С. Никоро — пианисткой в кинотеатре.

В чем причина лысенковщины? Другими словами, каким образом такой разгром науки случился только с генетикой и только в нашей стране? Причин несколько.

1. Можно считать главным то, что классическая теория наследования вступала в очевидное противоречие с марксистскими догмами. В самом деле, нужно строить коммунистический рай на Земле, а как в него войдут «родимые пятна капитализма»: воры, мошенники, бродяги, проститутки, сутенеры, наркоманы? Либо их нужно перевоспитать и тем самым «улучшить» их наследственность, либо не удастся построить рай. Генетики не обещали улучшить наследственность, а для Лысенко пообещать это ничего не стоило.

2. После жесточайшего уничтожения элиты крестьянства — раскулачивания и коллективизации — сельскохозяйственное производство оказалось полностью разгромленным и спасти его могло только чудо. Генетики не обещали чуда. Лысенко и Презент обещали и это.

3. По мнению Ж. А. Медведева, как Энгельс, так и Сталин были ламаркистами. Поэтому вождю были ближе простые, без затей, и такие желанные ламаркистские предложения Лысенко.

4. Только в нашей стране существовала возможность администрирования во всех сферах жизни, в том числе в науке.

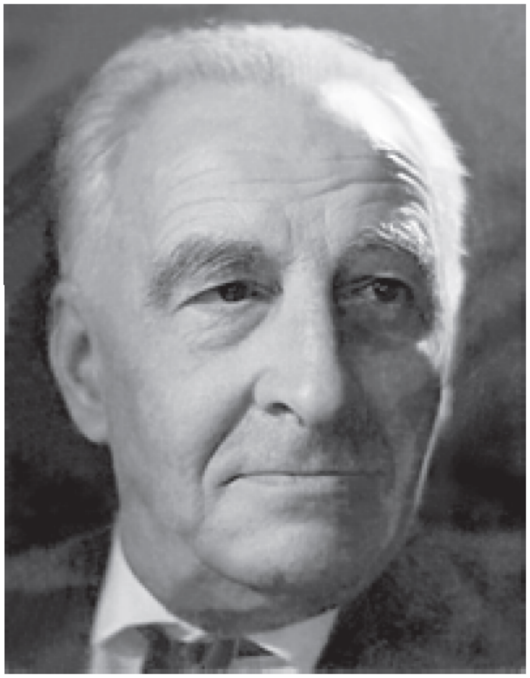
5. Лысенко не имел строгой научной экспериментальной базы. Все его положения проверялись на просторах полей рядовыми колхозниками. В условиях массового террора неудача «эксперимента», поддержанного самим «отцом народов», могла означать только одно. Отсюда массовые подделки результатов в отчетах, посылаемых в адрес Лысенко с мест [Медведев, 1993].

6. У Лысенко была и косвенная международная поддержка. Многие прогрессивные ученые, считая, что в России строится передовое общество, опасались, что открытая критика помешает строительству социализма. Г. Мёллер, Ж. Моно, Дж. Холдейн, Пренан, Ж. Браше, А. Тессье, Брайн делали все возможное, чтобы не допустить публичного развенчания «мичуринской науки» [Эленс, 1994].

Все это объясняет, почему в данной конкретной социально-исторической обстановке лысенковщина и разгром генетики в России были неизбежны.

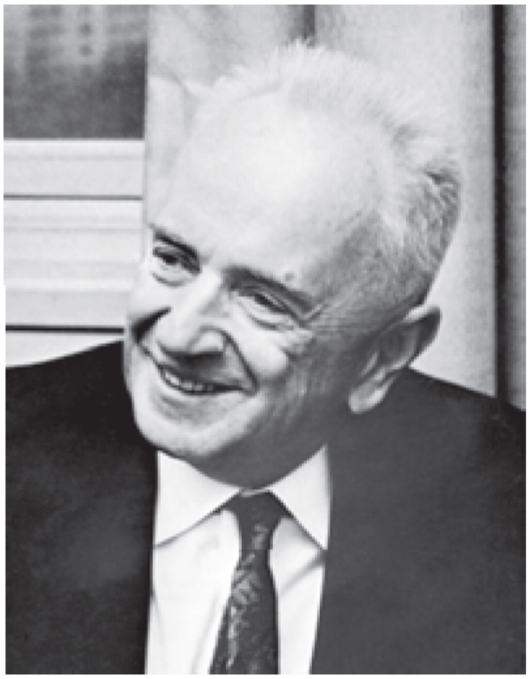
После смерти Сталина началось постепенное восстановление генетики. Стали появлять-

Рисунок 1.24



Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский (1900–1981)

Рисунок 1.25



Феодосий Григорьевич Добржанский (1900–1975)

ся разрозненные публикации с критикой Лысенко. Сначала авторами были химики и физики, затем к ним присоединились биологи (В. Н. Сукачев, А. А. Любищев, Ж. А. Медведев, В. С. Кирпичников).

Решающий перелом наступил в 1957 г. М. Е. Лобашев начал читать генетику в Ленинградском университете, в Новосибирске в этом же году М. А. Лаврентьев решил основать Институт цитологии и генетики в структуре Сибирского отделения АН СССР. В Киевском университете с 1958 г. генетику начал читать П. К. Шкварников. И. В. Курчатов организовал в своем суперсекретном Институте атомной энергии радиобиологический отдел (ныне Институт молекулярной генетики РАН). Тем не менее вплоть до 1965 г. нельзя было негативно отзываться о сессии ВАСХНИЛ 1948 г., упоминать о том, что преподают генетику в ЛГУ, о строительстве Института в Новосибирске, о подготовке Лобашевым первого послевоенного учебника по генетике. Все это делалось на полулегальном уровне.

Более того, «наука подверглась открытиям Ольги Борисовны»: О. Б. Лепешинская заявила, что клетки возникают не путем митотического деления по принципу Р. Вирхова *omne cellula ex cellula*, а непосредственно из «живого вещества» — например, из протухшего яичного желтка. Принцип же Вирхова был объявлен «выдумкой буржуазного идеалиста». Лысенко поддержал Лепешинскую. Нашлось много сторонников из представителей академической науки: академик А. И. Опарин, профессор ЛГУ П. В. Макаров и др.

Другая «теория», поддержанная Лысенко, была предложена Г. И. Бошьяном, полагавшим, что вирусы могут трансформироваться в бактерии и обратно.

Интересно сравнить то, что делалось в 50-е гг. за рубежом (см. разд. 1.2) и в России: расшифровка структуры ДНК и генетического кода там и средневековая охота на ведьм у нас.

Перестройка, начатая М. С. Горбачевым, изменила отношение руководства страны к генетике. Осенью 1988 г., через 40 лет после августовской сессии ВАСХНИЛ, состоялась конференция по генетике, на которой были подведены итоги развития этой науки в России и СССР. По результатам конференции через два года, в 1990 г., большая группа крупных генетиков была награждена правительственными наградами. Золотые Звезды Героев Социалистического Труда получили Н. П. Дубинин, В. С. Кирпичников, И. А. Рапопорт, Ю. И. Полянский, В. А. Струнников, А. Л. Тахтаджян и С. М. Гершензон. Еще около 20 человек получили ордена.

Неизвестно, на сколько лет задержал развитие генетики и всей науки в России «великий

реформатор» Б. Н. Ельцин. Обвальный выезд ученых среднего возраста, занятых во всех сферах науки, происшедший с начала 90-х гг., отсутствие финансирования исследований, закупок научной литературы, ничтожный, в несколько раз ниже среднего по России, уровень оплаты труда в сфере науки — вот результат очередного эксперимента с целой, отдельно взятой страной.

Московская школа генетики

В 1917 г. по инициативе Н. К. Кольцова был организован Институт экспериментальной биологии, в котором были начаты исследования по генетике [см. более подробно: Дубинин, 1967].

Вокруг Кольцова сплотились ученые, со временем ставшие крупнейшими генетиками и цитологами: С. С. Четвериков, А. С. Серебровский, М. М. Завадовский, Г. И. Роскин, П. И. Живаго, С. Л. Фролова, С. Н. Скадовский. Созданию школы Н. К. Кольцова во многом способствовало то, что он был профессором Московского университета, и это позволило ему широко привлечь в науку талантливую молодежь. Н. К. Кольцов также заведовал генетическим отделом Комиссии по изучению естественных производительных сил (КЕПС) Академии наук. Деятельность этого отдела была связана со многими работами по генетике сельскохозяйственных животных. Кольцов и его сотрудники — А. С. Серебровский, Б. Н. Васин, Я. Л. Глембоцкий — впервые в СССР начали систематические работы по генетике животных. С 1924 г. С. С. Четвериков начал читать в МГУ самостоятельный курс генетики. Исключительно важное значение для последующего развития генетики имела работа С. С. Четверикова «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики» (1926). В плане разработки высказанной концепции под руководством С. С. Четверикова был проведен цикл работ по экспериментальной проверке насыщенности мутациями природных популяций дрозофилы. В этой работе приняли участие Б. Л. Астауров, Н. К. Беляев, С. М. Гершензон, П. Ф. Рокицкий, Д. Д. Ромашов.

С использованием рентгеновских лучей для индукции мутаций были проведены исследования ступенчатого аллелизма гена *scute* (Н. П. Дубинин, А. С. Серебровский, С. Г. Левит, И. И. Агол, Б. Н. Сидоров, Л. В. Ферри, А. Е. Гайсинович, Н. И. Шапиро).

В 1932 г. в Институте Н. К. Кольцова была организована лаборатория цитогенетики. Здесь были проведены исследования только что открытого феномена — эффекта положения гена *ci* («эффекта Дубинина»). В этих работах приняли участие ставшие впоследствии выдающимися генетиками Б. Н. Сидоров и В. В. Хвостова.

Проведены ювелирные эксперименты по направленному изменению числа и структуры хромосом (Н. П. Дубинин, И. Е. Трофимов, Н. Н. Соколов, Б. Ф. Кожевников), в частности, удалось создать на основе четыреххромосомного вида дрозофил трех- и пятихромосомные расы. Были обоснованы принципы хромосомной изменчивости в популяциях (Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов, Г. Г. Тиняков).

В 1932 г. в Москве был создан Медико-генетический институт, которым в течение ряда лет руководил С. Г. Левит. Трудами самого Левита, а также С. Н. Ардашникова, Р. П. Мартыновой и других были заложены основы важнейших направлений медицинской генетики.

Кафедрой генетики в МГУ с 1930 по 1946 г. руководил А. С. Серебровский. На кафедре работали С. И. Алиханян, Р. Б. Хесин-Лурье, Н. И. Шапиро.

В середине 50-х гг. Н. П. Дубинин, возглавив борьбу против лысенковщины, организовал лабораторию радиационной генетики в Институте биофизики АН СССР. В ней удалось собрать группу выдающихся ученых старшего поколения: Я. Л. Глембоцкого, Б. Н. Сидорова, Н. Н. Соколова, М. Л. Бельговского, Г. Г. Тинякова, В. В. Хвостову, А. А. Прокофьеву-Бельговскую, М. А. Арсеньеву, Р. Б. Хесина-Лурье, В. В. Сахарова, а также много талантливой молодежи, среди которых были А. П. Акифьев, Г. А. Дворкин, Л. Г. Дубинина, Г. П. Македонов, В. А. Тарасов, В. А. Шевченко и др. Лаборатория радиационной генетики стала очагом возрождения генетики в нашей стране. В 1966 г. на основе этой лаборатории был создан новый Институт общей генетики (ныне имени Н. И. Вавилова). Директором его со дня основания до 1981 г. был Н. П. Дубинин.

В 1958 г. в Институте химической физики АН СССР был организован отдел химической генетики под руководством И. А. Рапопорта. В том же году крупный научный центр по генетике был создан в радиобиологическом отделе Института атомной энергии (ныне имени И. В. Курчатова). Главными лабораториями в нем руководили Р. Б. Хесин-Лурье, С. И. Алиханян, Н. И. Шапиро. Ныне это Институт молекулярной генетики РАН.

В 1990 г. в системе Российской академии наук создан Институт биологии гена под руководством Г. П. Георгиева.

Кафедра генетики Санкт-Петербургского университета

Особое место в развитии российской генетики занимает первая в России кафедра генетики Санкт-Петербургского (Ленинградского) университета [более подробно см.: Инге-Вечтомов, 1994; Исследования по генетике, 1994].

«13 сентября 1913 года ректор Санкт-Петербургского университета проф. Э. Д. Гримм официально объявил студентам, профессорам и преподавателям естественного отделения, что в среду 18 сентября от 2 до 3 ч пополудни приват-доцент Юрий Александрович Филипченко прочтет вступительную лекцию к впервые введенному в университете России курсу „Учение о наследственности и эволюции“» [Кайданов, 1994. С. 7]. Так начиналась генетика в России. Вскоре Филипченко издает первые учебники «Изменчивость и эволюция» (1915) и «Наследственность» (1917), а в 1919 г. он основал кафедру генетики, которой руководил до конца жизни.

История кафедры с 1931 по 1942 г. связана с именами выдающихся генетиков: Н. И. Вавилова, Г. Д. Карпеченко, Г. А. Левитского, Л. И. Говорова, погибших в результате репрессий 30–40-х гг. Среди довоенных выпускников и сотрудников кафедры немало блестящих имен: Ф. Г. Добржанский, А. А. Прокофьева-Бельговская, Н. Н. Медведев, Ю. Я. Керкис, Н. Н. Колесник, М. Л. Бельговский, М. Е. Лобашев, Ю. Л. Горощенко, Т. К. Лепин, Я. Я. Лус, А. И. Зуйтин, И. А. Рапопорт, Ф. А. Смирнов, Р. Л. Берг.

Новый этап в развитии кафедры, а вместе с ней и генетики в СССР начался в 1957 г. и связан с именем нового заведующего — М. Е. Лобашева (1907–1971). Он издал учебник по генетике (1963, 1967) и начал подготовку нового поколения генетиков. Из выпускников кафедры выросли многие доктора наук и профессора, имеющие огромную международную известность: Н. Ф. Батыгин, Е. С. Беляева, М. Д. Голубовский, И. Н. Голубовская, И. С. Губенко, И. А. Захаров, С. Г. Инге-Вечтомов, К. В. Квитко, Л. З. Кайданов, В. Г. Смирнов, И. М. Суриков, Л.А. Чубарева, А. Л. Юдин, Н. К. Янковский и др.

С 1973 г. кафедрой руководит С. Г. Инге-Вечтомов.

Институт цитологии и генетики СО РАН

Институт цитологии и генетики был организован в составе Сибирского отделения Академии наук в 1957 г. по инициативе и при поддержке крупнейших ученых страны, прежде всего М. А. Лаврентьева, И. В. Курчатова, В. А. Энгельгардта. Это был первый самостоятельный генетический институт, созданный после лысенковского погрома. Организацию Института и определение основных направлений исследований возглавил выдающийся российский генетик, в то время член-корреспондент, позднее академик, Н. П. Дубинин (рис. 1.26). Институт был призван возродить генетику в России, вернуть к научной деятельности уволенных и репрессированных ученых, сформировать новое поколение генетиков путем активного привлечения выпускников Московского, Ленинградского, только что образованного Новосибирского и других ведущих университетов страны.

Рисунок 1.26

Николай Петрович Дубинин
(1907–1998)

Для решения этих задач Н. П. Дубинин пригласил для работы в Институте представителей крупных генетических школ, учеников Н. И. Вавилова, Н. К. Кольцова, С. С. Четверикова и А. С. Серебровского: В. В. Хвостову, А. Н. Луткова, Ю. Я. Керкиса, П. К. Шкварникова, З. С. Никоро, Ю. П. Мирюту, И. Д. Романова, Н. А. Плохинского, Ю. О. Раушенбаха, Д. К. Беляева, В. Б. Енкена, Д. Ф. Петрова, Г. А. Стакан, Р. П. Мартынову, Е. П. Раджабли, не имевших в то время возможности заниматься генетикой.

Активное участие в организации Института принимали такие крупные генетики, как

Рисунок 1.27

Дмитрий Константинович Беляев
(1917–1985)

Рисунок 1.28

Владимир Константинович Шумный
(р. 1934)

А. А. Прокофьева-Бельговская, Н. Н. Соколов, Б. Н. Сидоров, Я. Л. Глембоцкий, Н. В. Тимофеев-Ресовский и др.

Наряду с этим в конце пятидесятых годов в Институт была привлечена большая группа молодых ученых, уже имевших опыт научной работы в области цитологии и генетики: Р. И. Салганик, И. И. Кикнадзе, Н. Б. Христолюбова.

С момента организации Института на него сразу обрушились нападки лысенковцев и были предприняты серьезные попытки его ликвидации. Первый директор Н. П. Дубинин смог проработать не более двух лет и был снят с должности по указанию Н. С. Хрущева. Однако он уже успел сформулировать основные направления исследований и пригласить ведущих ученых-генетиков. В ноябре 1959 г. из США через Китай возвращался Н. С. Хрущев, активно поддерживавший Т. Д. Лысенко. От Пекина до Новосибирска в одном самолете с ним летел председатель Сибирского отделения АН СССР академик М. А. Лаврентьев. Уже с борта самолета он дал телеграмму, что Н. С. Хрущев приказал снять Н. П. Дубинина с поста директора ИЦиГа, как вейсманиста-морганиста. В этот же день Н. П. Дубинин покинул Новосибирск.

В 1959 г. директором Института стал кандидат биологических наук, впоследствии академик, Д. К. Беляев (рис. 1.27). Именно ему пришлось выдержать всю тяжесть противостояния с властями в процессе формирования Института, создания его инфраструктуры и воспитания нового поколения генетиков. Если Н. П. Дубинин заложил прочный фундамент Института, то Д. К. Беляев создал на этом фундаменте сам Институт и руководил им до конца 1985 г. Несомненно, что оба этих человека внесли огромный вклад в возрождение генетики в России.

В 60–70-х гг. сформировалось новое поколение молодых талантливых ученых, выросших уже в Институте: Е. С. Беляева, Л. А. Васильева, И. Н. Голубовская, М. Д. Голубовский, А. Д. Груздев, И. С. Губенко, В. А. Драгавцев, Л. И. Корочкин, С. И. Малецкий, С. И. Раджабли, В. А. Ратнер, А. И. Шерудило и др.

Начиная с 1985 г. по настоящее время Институт возглавляет член-корреспондент АН, впоследствии академик, В. К. Шумный (рис. 1.28), выпускник Московского университета, работающий в Институте со дня его основания и прошедший все ступени научного роста, начиная с должности старшего лаборанта.

По положению на 1992 г. в штате Института было уже 1003 человека, в том числе 433 научных сотрудника, из них два академика РАН и один член-корреспондент РАН, 44 доктора и 199 кандидатов наук. К сожалению, мертвящее дыхание неумело проводимых социально-экономических реформ коснулось и Института.

В 90-х гг. свыше 140 молодых ученых (в возрасте 30–45 лет) выехали для работы за границу и очень скоро почти все они потеряли с ним связь.

Главная идея развития Института — интеграция молекулярных, клеточных, онтогенетических и популяционных исследований для понимания генетических механизмов изменчивости и эволюции. Особое внимание уделяется созданию генетических моделей как на растениях, так и на животных для изучения генетической структуры сложных в функциональном отношении признаков — поведения, реактивности на стресс, систем размножения, наследственных патологий у животных и человека, симбиотической азотфиксации у растений и многих других признаков.

Можно условно выделить три основных направления научных исследований Института:

1) Структурно-функциональная организация генетического материала на уровне генома, хромосом и генов. Реконструкция генома, трансгенез у животных и растений.

2) Молекулярно-генетические и генетико-эволюционные основы функционирования физиологических систем, обеспечивающих важнейшие процессы жизнедеятельности. Хромосомная и генная диагностика наследственных и мультифакторных заболеваний.

3) Генетико-эволюционные и экологические основы биологии популяций и биоразнообразия. Разработка новых методов генетики и селекции животных и растений для эффективного использования их генофондов.

Наряду с фундаметальными исследованиями значительное внимание в Институте уделяется прикладным разработкам. Их перечень за последние годы составляет около 48 работ, защищенных патентами или авторскими свидетельствами. Среди них штаммы-продуценты, сорта и гибриды растений, породы, линии животных, лекарственные препараты, средства защиты растений, биотехнологии.

Огромное значение для Института имеет кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета. В ее создании активное участие приняли Д. К. Беляев, Ю. Я. Керкис, В. В. Хвостова, И. И. Кикнадзе, В. А. Ратнер. Принцип тесного контакта академической науки и университетского образования был положен в основу этой кафедры. Многие сотрудники Института являются преподавателями Новосибирского государственного университета. Выпускники кафедры составляют костяк Института и многих других генетических лабораторий Сибири.

Начало третьего тысячелетия новосибирский Институт цитологии и генетики встретил как самое большое генетическое учреждение России: в его штате более 930 человек, 443 научных сотрудника входят в состав 66 подразделений. В штате 3 академика и один член-корреспондент РАН, 56 докторов и 248 кандидатов наук.

Литература к разделу 1.3

Акифьев А. П., Дубинина Л. Г. Очерк научной биографии академика Н. П. Дубинина // Дубинин Н. П. Избранные труды. Т. 1: Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 10–56.

Актуальные вопросы современной генетики / Ред. С. И. Алиханян. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1966. 602 с.

Александров В. Я. Трудные годы советской биологии. Записки современника // СПб.: Наука, 1992. 264 с.

Астауров Б. Л. О генетике и ее истории // Вопр. ист. естествозн. и техн. 1987. № 3. С. 79–88.

Астауров Б. Л., Рокицкий П. Ф. Николай Константинович Кольцов. М.: Наука, 1975. 108 с.

Бабков В. В. Август 1948 и судьбы медицинской генетики // Вестн. ВОГиС. 1998. № 6. С. 6–11.

Бабков В. В. О Н. В. Тимофееве-Ресовском // Вестн. ВОГиС. 2000. № 15. С. 2–16.

Выдающиеся советские генетики / Под ред. Д. К. Беляева, В. И. Иванова. М.: Наука, 1980. 150 с.

Ватти К. В., Захаров И. А., Инге-Вечтомов Н. Г., Пономаренко В. В., Тихомирова М. М., Фадеева Т. С. М. Е. Лобашев и проблемы современной генетики. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. 143 с.

Гайсинович А. Е. Зарождение генетики. М.: Наука, 1967. 195 с.

Гайсинович А. Е. Зарождение и развитие генетики. М.: Наука, 1988. 423 с.

Генетика — селекции растений. Районированные сорта и перспективные формы сельскохозяйственных растений Института цитологии и генетики СО АН СССР за 25 лет / Под ред. В. К. Шумного. Новосибирск: Изд. Ин-та цитологии и генетики, 1983. 34 с.

Гершензон С. М. Тропою генетики. Киев: Наук. думка, 1992. 176 с.

Голубовский М. Д. Гений и генетика: [О В. П. Эфроимсоне] // Vestnik. 1999. Vol. 11.1, № 6 (213). P. 32–35.

Голубовский М. Д. Добжанский в двух мирах: [К 100-летию со дня рождения] // Вестн. ВОГиС. 2000. № 12. С. 9–15.

Гранин Д. Зубр: [О Н. В. Тимофеевом-Ресовском] // Новый мир. 1987. № 1. С. 19–95. № 2. С. 7–92.

Дубинин Н. П. Генетика // Развитие биологии в СССР. М.: Наука, 1967. С. 583–597.

Дубинин Н. П. Генетика — страницы истории. Кишинев: Штиинца, 1988. 398 с.

Дубинин Н. П. Вечное движение. 3-е изд. М.: Изд-во полит. лит., 1989. 445 с.

Захаров И. А. Краткие очерки по истории генетики. М.: Биоинформсервис, 1999. 72 с.

Инге-Вечтомов С. Г. Кафедра генетики и селекции Петербургского университета — первая кафедра генетики в России // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1012–1021.

Инге-Вечтомов С. Г. О системе генетического образования в Санкт-Петербургском государственном университете // Вестн. ВОГиС. 2000. № 11. С. 4–6.

Институт цитологии и генетики. Внешторгиздат, Изд. N7044H, 1989. 64 с.

Информационные материалы по проблемам генетики и селекции. Вып. 3. Пущино, 1991. 56 с.

Исследования по генетике. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 1994. Вып. 11. 115 с.

Кайданов Л. З. Формирование кафедры генетики и экспериментальной зоологии в Петроградском университете (1913–1920) // Исследования по генетике. 1994. Вып. 11. С. 6–12.

Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. 539 с.

Лобашев М. Е. Генетика в Ленинградском университете // Исследования по генетике. 1967. Вып. 3. С. 1–18.

Лобашев М. Е. Полвека советской генетики // Генетика. 1967. Т. 10. С. 15–31.

Медведев Ж. А. Взлет и падение Лысенко: История билогической дискуссии в СССР. М.: Книга, 1993. 348 с.

Музрукова Е. Б., Назаров В. И., Ченоснова Л. В. Из истории советской генетики: (Интервью с академиком Н. П. Дубининым) // Репрессированная наука. СПб.: Наука, 1994. С. 243–251.

Н. В. Тимофеев-Ресовский / Сост. В. И. Корогодин; Объединенный институт ядерных исследований. Дубна, 2000. 52 с.

Н. И. Вавилов: Документы и фотографии / Сост. Н. Я. Московченко и др. СПб.: Наука, 1995. 165 с.

Наука, Академгородок, университет: Воспоминания. Очерки. Интервью. Новосибирск: Изд. НГУ, 1999. Вып. 1. 479 с.

Нево Э. К 90-летию со дня рождения академика Национальной академии наук Украины Сергея Михайловича Гершензона // Экспериментальная онкология. 1996. Т. 18. С. 315–316.

Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский: Очерки, воспоминания, материалы / Отв. ред. Н. Н. Воронцов. М.: Наука, 1993. 393 с.

О положении в биологической науке: Стеногр. отчет сессии Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук им. В. И. Ленина, 31 июля — 7 августа 1948 г. М.: Огиз-Сельхоз., 1948. 536 с.

Памяти Николая Петровича Дубинина (1907–1998) // Генетика. 1998. Т. 34. С. 1021–1024.

Полынин В. Пророк в своем отечестве: [О Н. К. Кольцове]. М.: Советская Россия, 1969. 126 с.

Ратнер В. А. Памяти С. М. Гершензона. Впереди событий и в стороне от признания // Вестн. ВОГиС. 1998. № 4. С. 1–4.

Резник С. Николай Вавилов. М.: Мол. гвардия. 1968. 334 с. (Жизнь замечательных людей).

Суд палача. Николай Вавилов в застенках НКВД: Биографический очерк. Документы / Сост. Я. Г. Рокитянский и др. М.: Akademia, 1999. 552 с.

Тимофеев-Ресовский Н. В. Избранные труды. М.: Медицина, 1996. 479 с.

Черный И. В., Древич В. Ф., Глазко В. И., Захаров И. К. Шкварников Петр Климентьевич // Вестн. ВОГиС. 2000. № 12. С. 2–9.

Шварц А. От зари до зари: [О С. С. Четверикове] // Москва. 1968. № 4.

Шестаков С. В., Асланян М. М. О преподавании генетики в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова // Вестн. ВОГиС. 2000. № 11. С. 6–7.

Шноль С. Э. Герои и злодеи российской науки. М.: Крон-Пресс, 1997. 462 с.

Шумный В. К. Непрерывающаяся нить жизни и познания // ЭКО. 1997. № 7 (277). С. 2–20.

Шумный В. К., Высоцкая Л. В., Жимулёв И. Ф., Захаров И. К. Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета: генетика в системе подготовки биологов // Вестн. ВОГиС. 2000. № 11. С. 7–11.

Шумный В. К., Жимулёв И. Ф. Памяти Н. П. Дубинина // Вестн. ВОГиС. 1998. № 3. С. 1–3.

Эленс А. Рецензия на книгу В. Я. Александрова «Трудные годы советской биологии. Записки современника» // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1130–1131.

Dickman S. A lifetime of struggle to do good science: [О С. М. Гершензоне] // Science. 1992. Vol. 258. P. 25–26.

Dobzhansky Th. Sergei Sergeevich Tshetverikov // Genetics. 1967. Vol. 55. P. 1–3.

Gershenson S. M. The grim heritage of lysenkoism: four personal accounts. IV. Diffucult years in soviet genetics // Quart. Rev. Biol. 1990. Vol. 65. P. 447–456.

Mangelsdorf P. C. Nikolai Ivanovich Vavilov, 1887–1942 // Genetics. 1953. Vol. 38. P. 1–4.

Глава 2
МЕНДЕЛИЗМ — ДИСКРЕТНОСТЬ В НАСЛЕДОВАНИИ ПРИЗНАКОВ

2.1. МОНОГИБРИДНОЕ СКРЕЩИВАНИЕ

2.1.1. Доминирование по Менделю

Любое скрещивание начинается с выявления признака. Признак — это определенное отдельное качество организма, по которому одна его часть отличается от другой или одна особь от другой. Признаком в генетическом смысле можно назвать любую особенность, выявляемую при описании организма: высоту, вес, форму носа, цвет глаз, форму листьев, окраску цветка, размер молекулы белка или его электрофоретическую подвижность. Признаки должны проявляться постоянно. Чтобы убедиться в их константности, Мендель на протяжении двух лет предварительно проверял различные формы гороха. Признаки должны быть контрастными. Мендель отобрал 7 признаков, каждый из которых имел по два контрастных проявления. Например, зрелые семена по морфологии были либо гладкими, либо морщинистыми, по окраске — желтыми или зелеными, окраска цветка была белой или пурпурной.

После определения признаков можно приступать к скрещиваниям, в которых используют генетические линии — родственные организмы, воспроизводящие в ряду поколений одни и те же наследственно константные признаки. Потомство от скрещивания двух особей с различной наследственностью называют гибридным, а отдельную особь — гибридом.

После того как Мендель скрестил формы гороха, различающиеся по 7 признакам, у гибридов проявился, или доминировал, только один из пары родительских признаков. Признак другого родителя (рецессивный) у гибридов первого поколения не проявлялся. Позднее это явление доминирования было названо первым законом Менделя (законом единообразия гибридов первого поколения или законом доминирования).

Мендель скрестил полученные гибриды между собой. Как он сам пишет, «в этом поколении наряду с доминирующими признаками вновь появляются также рецессивные в их полном развитии и притом в ясно выраженном среднем отношении 3 : 1, так что из каждых четырех растений этого поколения три получают доминирующий и одно — рецессивный признак» [Мендель, 1923. С. 12]. Всего в данном опыте было получено 7324 семени, из которых гладких было 5474, а морщинистых — 1850, откуда выводится соотношение 2,96 : 1. Данные этого опыта свидетельствуют о том, что рецессивный признак не теряется и в следующем поколении он снова проявляется (выщепляется) в чистом виде. Г. де Фриз в 1900 г. назвал это явление законом расщепления, а позднее его назвали вторым законом Менделя.

Разные классы потомков (с доминантным и рецессивным проявлением) Мендель вновь самоопылил. Оказалось, что признаки с рецессивным проявлением сохраняются неизменными в последующих поколениях после самоопыления. Если же самоопылить растения из доминирующего класса, то вновь будет расщепление, на этот раз в соотношении 2 : 1. Как пишет сам Мендель: «Отсюда ясно, что из тех

Дополнение 2.1

Генетическая символика

Скрещивание обозначают знаком умножения — ×. В схемах на первом месте принято ставить генотип женского пола. Пол принято обозначать следующими символами:

женский — ♀ (зеркало Венеры),

мужской — ♂ (щит и копье Марса).

Родительские организмы, взятые в скрещивание, обозначают буквой *P* (от латинского Parento — родители). Гибридное поколение обозначают буквой *F* (от латинского Filii — дети) с цифровым индексом, соответствующим порядковому номеру гибридного поколения [Лобашев, 1967. С. 105]. Доминирующий признак Мендель предложил обозначать заглавной буквой, а рецессивный — той же буквой, но строчной.

форм, которые в первом поколении имеют доминирующий признак, у двух третей он носит гибридный характер, но одна треть с доминирующим признаком остается константной». И далее заключает: «...гибриды форм, обладающих парой отличных признаков, образуют семена, из которых половина дает вновь гибридные формы, тогда как другая дает растения, которые остаются константными и удерживают в равных количествах или доминирующий, или рецессивный признаки» [Мендель, 1923. С. 16].

Для объяснения найденных закономерностей Мендель предположил, что в оплодотворении участвуют «пыльцевые» и «зародышевые» формы *A* и *a* и они «вступают в соединение приблизительно в равных долях ... случай решает, какой из двух видов пыльцы соединится с каждой отдельной зародышевой клеткой» [Там же. С. 29]. Другими словами, гаметы каждого из родителей несут только по одному из этих факторов. В гибридах гаметы соединяются, но, поскольку действует закон доминирования, внешне гибридные растения выглядят одинаково. Рецессивный детерминант в клетке сохраняется, и это становится очевидным во втором поколении, чему предшествует расхождение доминантного и рецессивного факторов по отдельным гаметам. По этой причине второй закон Менделя иногда называют «законом чистоты гамет». Для облегчения расчета сочетаний разных типов гамет английский генетик Р. Пэннет предложил запись в виде решетки — таблицы с числом строк (столбцов) по числу типов гамет, образуемых скрещиваемыми особями (широко известна как решетка Пэннета), а на пересечении вписывают образующиеся сочетания гамет. Так, в скрещивании *Aa* × *Aa* будут следующие гаметы и их сочетания:

Гаметы	*A*	*a*
A	*AA*	*Aa*
a	*Aa*	*aa*

Скрещивание, выполненное Менделем, можно показать на следующей схеме:

$$P \qquad AA \times aa$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \qquad Aa \times Aa$$
$$\downarrow$$
$$F_2 \qquad \underset{1}{AA} \quad \underset{2}{Aa \quad Aa} \quad \underset{1}{aa}$$

с проявлением доминантного признака — с проявлением рецессивного признака

В F_2 можно выделить два типа расщепления: 3 : 1 по внешнему проявлению и 1 : 2 : 1 по наследственным потенциям. Для «внешней» характеристики признака В. Иогансен в 1909 г. предложил термин «фенотип», а для характеристики истинно наследственных задатков — «генотип». Поэтому расщепление по генотипу в F_2 моногибридного скрещивания составляет ряд 1 : 2 : 1, а по фенотипу — 3 : 1.

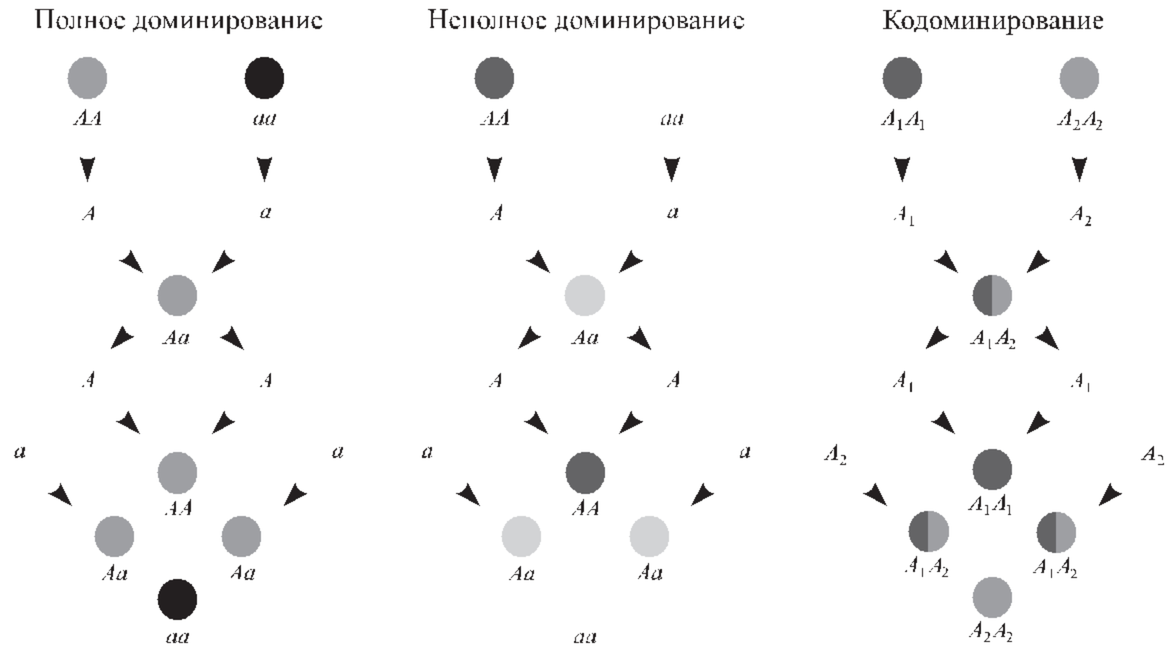
Для обозначения признаков *A* и *a* У. Бэтсон в 1902 г. предложил термин «аллеломорфы». В 1926 г. В. Иогансен трансформировал его в «аллель». Пара аллелей соответствует двум контрастным состояниям гена. Термин «ген» был предложен также Иогансеном в 1909 г.

Константные формы *AA* и *aa*, которые в последующих поколениях не дают расщепления, У. Бэтсон в 1902 г. предложил называть гомозиготными, а формы *Aa*, дающие расщепление, — гетерозиготными.

Константные признаки, контролируемые разными аллелями генов, обнаружены у всех живых организмов. Приведем некоторые наследственные признаки человека [Вилли, 1966. С. 534–535]:

Доминантный признак	**Рецессивный признак**
Темные волосы	Светлые волосы
Нерыжие волосы	Рыжие волосы
Вьющиеся волосы	Прямые волосы
Сильная волосатость тела	Слабая волосатость тела
Раннее облысение	Нормальный срок облысения
Черная кожа	Белая кожа
Карие глаза	Голубые или серые глаза
Наличие эпиканта (складки верхнего века)	Отсутствие эпиканта
Близорукость	Нормальное зрение
Дальнозоркость	Нормальное зрение
Свободные ушные мочки	Приросшие ушные мочки
Толстые губы	Тонкие губы
Большие глаза	Маленькие глаза
Длинные ресницы	Короткие ресницы
Низкий рост	Высокий рост
Гипертония	Нормальное давление
Нормальное состояние	Гемофилия
Нормальное состояние	Сахарный диабет
Нормальный слух	Врожденная глухота
Мигрень	Нормальное состояние
Нормальное состояние	Фенилкетонурия

Рисунок 2.1



Типы доминирования различных аллелей

2.1.2. Анализирующее скрещивание

Чтобы проверить, является ли данный организм гомо- или гетерозиготным, можно, как предложил Мендель, скрестить его с исходной гомозиготой по рецессивным аллелям. Такой тип скрещивания получил название анализирующего.

$$Aa \times aa \qquad AA \times aa$$
$$\downarrow \qquad\qquad \downarrow$$
$$1Aa : 1aa \qquad Aa$$

Если особь была гомозиготной по доминантному признаку, все потомки принадлежат к одному классу. Если в результате анализирующего скрещивания расщепление и по фенотипу, и по генотипу составляет 1 : 1, это свидетельствует о гетерозиготности одного из родителей.

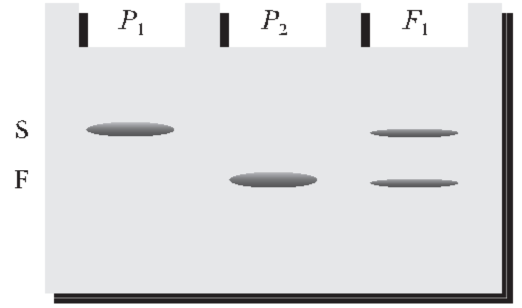
2.1.3. Неполное доминирование и кодоминирование

Кроме полного доминирования, описанного Менделем, найдены также неполное, или частичное, доминирование и кодоминирование (рис. 2.1). При неполном доминировании гетерозигота имеет фенотип, промежуточный между фенотипами гомозигот. При этом правило Менделя о единообразии фенотипа в F_1 соблюдается. В F_2 и по фенотипу, и по генотипу расщепление выражается соотношением 1 : 2 : 1. Примером неполного доминирования может служить промежуточная розовая окраска цветка у гибридов ночной красавицы *Mirabilis jalapa*, полученных от скрещивания красноцветковой и белоцветковой форм.

Неполное доминирование оказалось широко распространенным явлением и было отмечено при изучении наследования окраски цветка у львиного зева, окраски оперения у андалузских кур, шерсти у крупного рогатого скота и овец и др. [см. подробнее: Лобашев, 1967].

Кодоминирование — это явление, когда оба аллеля дают равноценный вклад в формирование фенотипа. Кодоминирование обычно выявляется на электрофореграммах ферментов (рис. 2.2).

Рисунок 2.2



Выявление аллелей белков-ферментов с разной электрофоретической подвижностью (S (slow) — низкая и F (fast) — высокая) у гибридов F_1

2.1.4. Отклонения от ожидаемого расщепления

Мендель [1923] отмечал, что «в гибридах и их потомках в последующих поколениях не должно происходить заметного нарушения в плодовитости» [с. 6]. В расщеплениях будут нарушения, если классы имеют разную жизнеспособность. Случаи отклонений от ожидаемого соотношения 3:1 довольно многочисленны.

Много десятилетий известно, что при скрещивании желтых мышей между собой в потомстве наблюдается расщепление по окраске на желтых и черных в соотношении 2 : 1. Аналогичное расщепление было обнаружено в скрещиваниях лисиц платиновой окраски между собой, в потомстве от которых появлялись как платиновые, так и серебристо-черные лисицы. Детальный анализ этого явления показал, что лисицы платиновой окраски всегда гетерозиготны, а гомозиготы по доминантному аллелю этого гена гибнут на эмбриональной стадии, гомозиготы по рецессивному аллелю имеют серебристо-черную окраску.

У овец доминантный аллель, дающий окраску ширази (серый каракуль), летален в гомозиготе, в результате чего ягнята гибнут вскоре после рождения, и расщепление также смещается в сторону 2 : 1 (ширази — черные). Летальным в гомозиготе является также доминантный аллель, обусловливающий линейное расположение чешуи у карпа [Лобашев, 1967]. Множество таких мутаций известно у дрозофилы (*N*, *Sb*, *D*, *Cy*, *L* и др.). Во всех случаях получается расщепление 2 : 1 вместо 3 : 1. Это отклонение не только не свидетельствует об ошибочности законов Менделя, но дает дополнительные доказательства их справедливости. Однако на этих примерах видно, что для выявления одного из классов потомков требуется провести дополнительную работу.

2.2. ДИГИБРИДНОЕ СКРЕЩИВАНИЕ

Г. де Фриз (1900) предложил дигибридами называть организмы, полученные от скрещивания особей, различающихся одновременно двумя парами альтернативных признаков; если признаков три пары — тригибридами, более — полигибридами.

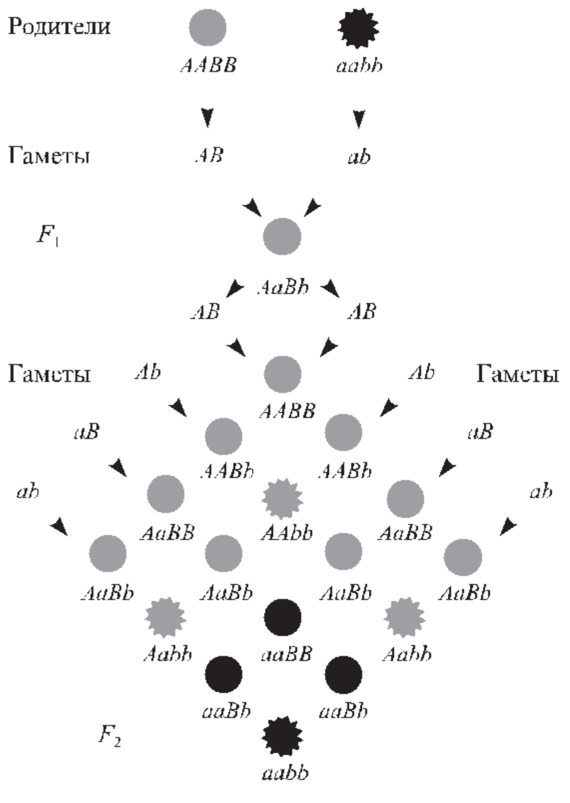
Мендель скрещивал формы гороха, различающиеся по двум парам признаков: с желтыми и гладкими семенами (*AB*) и с зелеными и морщинистыми (*ab*). В F_2 было получено 556 семян, из них 315 было гладких желтых, 101 морщинистое желтое, 108 гладких зеленых, 32 морщинистых зеленых. Гаметы в этом скрещивании образуются в соответствии с расщеплением хромосом в мейозе, сочетания гамет могут быть определены с помощью решетки Пэннета (рис. 2.3). Всего можно получить 16 комбинаций гамет, из них 9 клеток, в которых есть хотя бы по одному доминантному аллелю из каждой пары, 3 комбинации, в которых встречается *A* аллель, а *b* в гомозиготе, еще три, в которых гомозиготным является *a*, и, наконец, один класс, в котором и *a*, и *b* — гомозиготы. Можно рассчитать ожидаемое расщепление для этих 4 фенотипических классов:

A–B– 556 × 9/16 = 313 (получено 315)
A–bb 556 × 3/16 = 104 (получено 101)
aaB– 556 × 3/16 = 104 (получено 108)
aabb 556 × 1/16 = 35 (получено 32)

Реальное расщепление идеально соответствует теоретически ожидаемому.

Если подсчитать число семян по каждой паре признаков отдельно, окажется, что отно-

Рисунок 2.3



Дигибридное скрещивание

шение числа гладких семян к числу морщинистых было 423 : 133, а желтых к зеленым — 416 : 140, т. е. для каждой пары соотношение было 3 : 1. Очевидно, что в дигибридном скрещивании каждая пара признаков при расщеплении в потомстве ведет себя так же, как в моногибридном скрещивании, т. е. независимо от другой пары признаков. Таким образом, Мендель объективно установил существование третьего закона наследования — закона независимого наследования признаков и сформулировал принцип генетической рекомбинации — появление потомства с комбинацией признаков, отличной от родительской. Рекомбинация связана с независимым расхождением хромосом при гаметогенезе или с кроссинговером (см. гл. 3).

Анализ полигибридных скрещиваний производится так же, как и дигибридных, однако с каждым увеличением числа признаков возрастает число комбинаций гамет.

Если у дигибрида, как мы видели, получается 16 комбинаций, у тригибрида их уже 64, а у тетрагибрида — 256.

Классическое расщепление 9 : 3 : 3 : 1 в дигибридном скрещивании получается не всегда. В частности, следует иметь в виду возможность неполного доминирования, приводящего к серьезным изменениям в частотах встречаемости разных фенотипических классов.

Для того чтобы в полигибридном скрещивании осуществились ожидаемые расщепления, необходимо также выполнение ряда условий:

1. Нахождение учитываемых генов в негомологичных хромосомах; число их при этом не может превышать гаплоидного числа хромосом у данного вида.
2. Равновероятное образование гамет всех сортов на основе случайного расхождения хромосом в мейозе.
3. Равновероятное созревание гамет всех типов.
4. Равновероятная встреча гамет при оплодотворении.
5. Равновероятная выживаемость зигот и взрослых организмов.
6. Относительная стабильность развития изучаемых признаков [Лобашев, 1967].

2.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ГЕНОВ

Один из первых примеров взаимодействия генов был обнаружен в начале XX в. при анализе наследования формы гребня у кур. Описано четыре разновидности форм гребней (рис. 2.4), при этом разные породы имеют характерную морфологию гребня: леггорны — листовидный, виандоты — розовидный, европейские — гороховидный, малайские — ореховидный.

В результате скрещиваний кур, имеющих розовидный и гороховидный гребни, в F_1 возникает новая форма гребня — ореховидный (из-за взаимодействия генов *A* и *B*).

P Розовидный × Гороховидный
AAbb *aaBB*
↓
F_1 *AaBb*
Ореховидный

Скрещивание гибридов F_1 дает следующие результаты в F_2:

	AB	*Ab*	*aB*	*ab*
AB	Орех. *AABB*	Орех. *AABb*	Орех. *AaBB*	Орех. *AaBb*
Ab	Орех. *AABb*	Розов. *AAbb*	Орех. *AaBb*	Розов. *Aabb*
aB	Орех. *AaBB*	Орех. *AaBb*	Горох. *aaBB*	Горох. *aaBb*
ab	Орех. *AaBb*	Розов. *Aabb*	Горох. *aaBb*	Листов. *aabb*

Потомство F_2 характеризуется следующими особенностями:

1. Присутствие доминантных аллелей двух генов *A* и *B* у 9/16 кур второго поколения ведет к образованию ореховидного гребня.
2. Присутствие гена *A* в гомо- или гетерозиготном состоянии при рецессивном *b* дает розовидную форму у 3/16 особей, а гены *aaB–* у 3/16 потомства дают гороховидный гребень.
3. Гомозиготы по обоим рецессивным генам *aabb* имеют новый фенотип — простой листовидный гребень. Этот признак в последующих скрещиваниях не дает расщепления.

Итак, взаимодействие доминантных генов *A* и *B* изменяет форму гребня. В этом случае расщепление в дигибридном скрещивании нарушается, однако очевидно, что общее соотношение классов 9 : 3 : 3 : 1 сохраняется.

При взаимодействии генов в случае дигибридных скрещиваний расщепление в F_2 по фенотипу может быть разнообразным: 9 : 7, 9 : 3 : 4, 13 : 3, 12 : 3 : 1, 15 : 1 и т. д. Но во всех случаях это видоизменение расщепления 9 : 3 : 3 : 1.

2.3.1. Комплементарное действие генов

К комплементарным относятся такие гены, которые при совместном действии в генотипе в гомо- или гетерозиготном состоянии (*A–B–*)

Рисунок 2.4

Формы гребней у кур.
Слева направо: розовидный, гороховидный, ореховидный, листовидный [Гершкович, 1968. С. 62]

обусловливают развитие нового признака. Действие же каждого гена в отдельности (*A–bb* или *aaB–*) воспроизводит признак лишь одного из скрещиваемых родителей. Впервые такого рода взаимодействие было обнаружено у душистого горошка *Lathyrus odoratus* [Лобашев, 1967]. В результате скрещивания гетерозигот *AaBb* между собой в F_2 мы имеем фенотипический класс, содержащий *A–B–* (9/16), а также фенотипический класс, заключающий остальные 7/16 потомства.

Молекулярные основы взаимодействия этих генов не ясны. Больше известно о взаимодействии генов окраски глаз у дрозофилы. У мутантов по гену *bw* глаза имеют коричневый цвет, у мутантов *st* глаза ярко-алые. Что происходит в скрещиваниях?

$$P \quad bw\ bw\ st^+\ st^+ \times bw^+\ bw^+\ st\ st$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad bw^+\ bw\ st^+\ st$$

Красные глаза

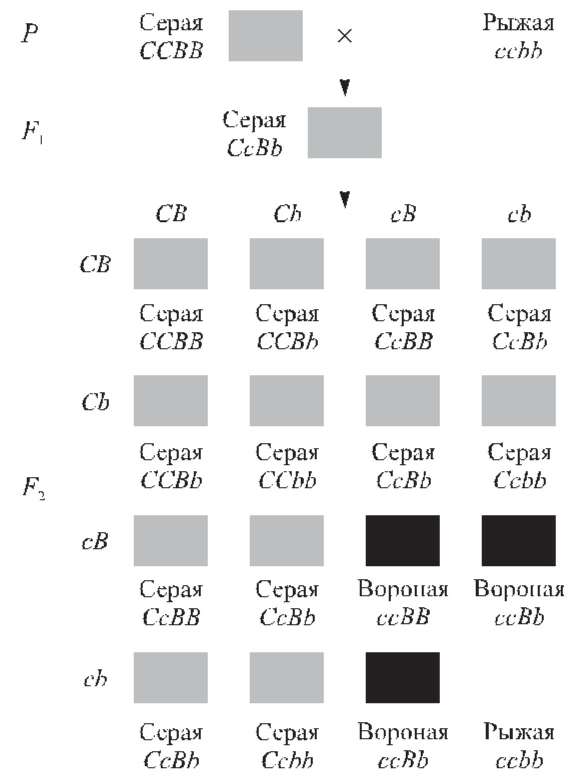
Скрещивание гибридов F_1 дает следующие расщепления в F_2:

	$bw^+ st^+$	$bw^+ st$	$bw\ st^+$	$bw\ st$
$bw^+ st^+$	$bw^+ st^+$ $bw^+ st^+$	$bw^+ st$ $bw^+ st^+$	$bw\ st^+$ $bw^+ st^+$	$bw\ st$ $bw^+ st^+$
$bw^+ st$	$bw^+ st^+$ $bw^+ st$	$bw^+ st$ $bw^+ st$	$bw\ st^+$ $bw^+ st$	$bw\ st$ $bw^+ st$
$bw\ st^+$	$bw^+ st^+$ $bw\ st^+$	$bw^+ st$ $bw\ st^+$	$bw\ st^+$ $bw\ st^+$	$bw\ st$ $bw\ st^+$
$bw\ st$	$bw^+ st^+$ $bw\ st$	$bw^+ st$ $bw\ st$	$bw\ st^+$ $bw\ st$	$bw\ st$ $bw\ st$

В результате получается обычное для дигибридного скрещивания расщепление: 9 частей потомков являются нормальными по фенотипу (bw^+– st^+–), еще три части — *bw* (*bw bw* st^+–), три части *st* (bw^+– *st st*) и еще одна часть — мухи с белыми глазами. Такого фенотипа не было ни у одного из родителей.

Объясняется это просто. Дело в том, что нормальная красная окраска глаза получается из смеси двух пигментов — коричневого, контролируемого геном st^+, и ярко-алого, контролируемого геном bw^+. Если мутирует ген st^+, в клетках нет коричневого пигмента и глаз становится ярко-алым, если мутирует ген bw^+, нет алого и глаз выглядит коричневым. В случае отсутствия обоих пигментов у мух *bw bw st st* глаз остается неокрашенным, т. е. белым.

Рисунок 2.5



Эпистаз при наследовании масти у лошадей

2.3.2. Эпистаз

Явление подавления действия одного гена другим, неаллельным ему геном называется эпистазом. При этом один доминантный ген подавляет действие неаллельного ему доминантного гена.

Явление эпистаза открыто при анализе наследования масти лошадей. Известно, что вороная окраска определяется доминантным аллелем *B*, рыжая — рецессивным аллелем *b*, доминантный аллель *C* из-за раннего поседения волоса дает серую масть. Нормальный аллель здесь *c*.

Гомозиготы и гетерозиготы по *C* всегда будут серыми из-за седины, независимо от того, какие аллели гена *B* будут у лошади.

P	*CCBB* × *ccbb*		
	Серая	Рыжая	
	↓		
F_1	*CcBb* × *CcBb*		
	Серая	Серая	
	↓		
F_2	C^-	B^-c	*ccbb*
	Серая	Вороная	Рыжая
	12 :	3 :	1

Это расщепление легко выводится из 9 : 3 : 3 : 1, поскольку 3/16 потомков, имеющих генотип bbC^-, по фенотипу также серые и, объединившись с 9/16, дают 12/16 (рис. 2.5).

2.3.3. Полимерия

До сих пор мы рассматривали наследование альтернативных признаков, т. е. различающихся качественно. Шведский генетик Г. Нильсон-Эле (1908) в скрещиваниях пшениц с красным и белым зерном в некоторых случаях в F_2 обнаружил расщепления 15 : 1, т. е. 15 красных и одно неокрашенное. Выяснилось далее, что в F_3 растения с наиболее интенсивной красной окраской и с чисто белым зерном не дают расщепления. Анализ же промежуточных форм показал, что красная окраска определяется двумя доминантными неаллельными генами. Интенсивность окраски зависит от числа доминантных аллелей, присутствующих в генотипе. Гены такого типа были названы полимерными. И поскольку эти гены одинаково влияют на один и тот же признак, их стали обозначать одной латинской буквой с указанием индекса для разных членов: A_1, A_2, A_3 и т. д.

Следовательно, исходные родительские формы, давшие расщепление 15 : 1, имели генотипы $A_1A_1A_2A_2$ и $a_1a_1a_2a_2$. Гибрид F_1 обладал генотипом $A_1a_1A_2a_2$, а в F_2 развились зерна с разным числом доминантных генов. Наличие всех четырех доминантных аллелей генов окраски $A_1A_1A_2A_2$ у 1/16 растений определяло самую интенсивную окраску зерна, 4/16 всех зерен F_2 имели три доминантных аллеля ($A_1A_1A_2a_2$), 6/16 — два аллеля ($A_1a_1A_2a_2$), 4/16 — один аллель ($A_1a_1a_2a_2$). Эти генотипы определяли промежуточные окраски. Гомозиготной по обоим рецессивным генам ($a_1a_1a_2a_2$) являлась 1/16 всех зерен, и эти зерна оказались неокрашенными.

Могут быть тригибридные комбинации по окраске. В опыте Нильсона-Эле тригибридное расщепление в F_2 по генам окраски зерен пшеницы давало соотношение 63 красных и 1 неокрашенное.

По типу полимерых генов наследуется пигментация кожи у человека. Например, в потомстве у негра и белой женщины (или наоборот) рождаются дети с промежуточным цветом кожи — мулаты. У супружеской пары мулатов рождаются дети с цветом кожи от черной до белой, что определяется комбинацией двух пар аллелей полимерных генов.

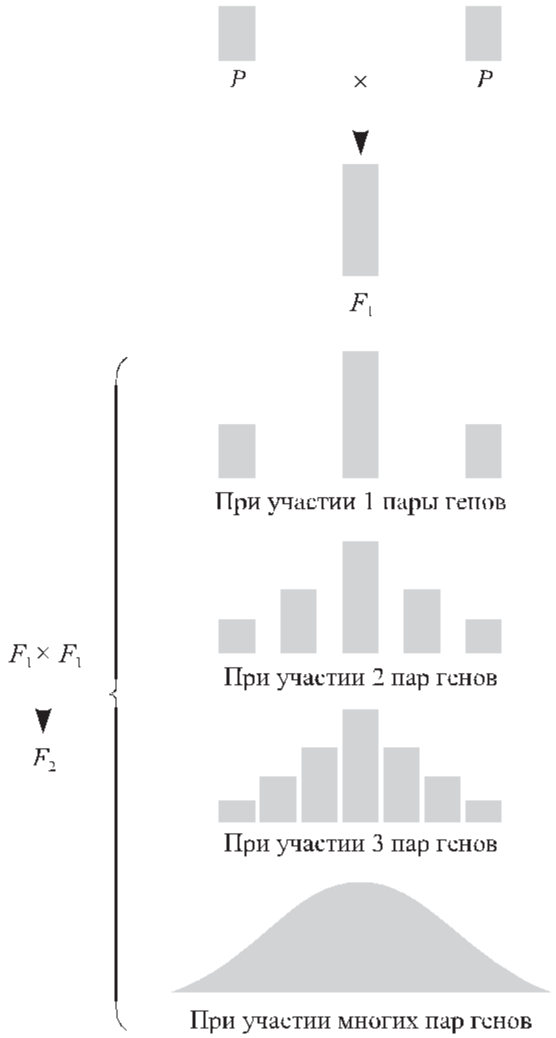
AABB × *aabb*
Негр Белый
↓
AaBb
Мулаты
↓

AABB	*AABb*	*AaBB*	*AaBb*	*AAbb*	*aaBB*	*Aabb*	*aaBb*	*aabb*
1/16	2/16	2/16	4/16	1/16	1/16	2/16	2/16	1/16
Негры	«Темные»		Мулаты			«Светлые»		Белые

2.4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ

В предыдущих разделах мы обсуждали наследование четко выражающихся в фенотипе признаков, относительно легко отличающихся от альтернативных им, таких, например, как окраска цветка у садового гороха, альбинизм, противостоящий нормальной пигментации, красный цвет глаз у дрозофилы. Такие признаки обычно называются качественными. Однако многим наследственным признакам нельзя дать достаточно точного качественного описания. Между особями наблюдаются малозаметные переходы по этим признакам, а при расщеплении нет ясно разграниченных фенотипических классов. Эти признаки приходится изучать путем измерений или подсчетов.

Рисунок 2.6



Зависимость числа фенотипических классов от числа пар генов, участвующих в формировании признака [Гершкович, 1968. С. 70]

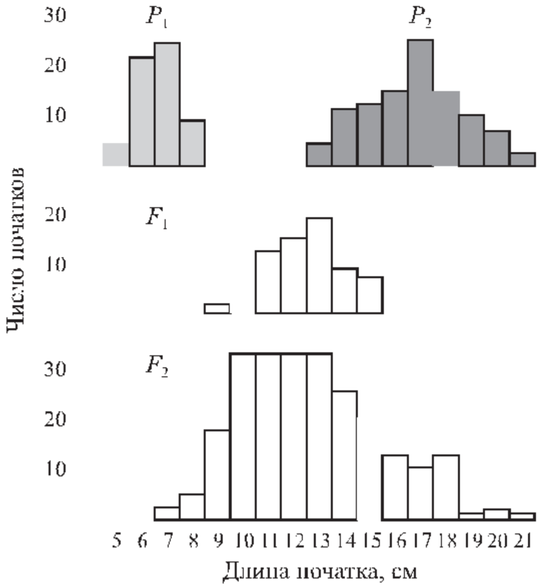
К таким признакам принадлежат вес, размеры тела, продуктивность растений, скороспелость, жирность молока, умственные способности человека. Подобные признаки принято называть количественными.

Строгой границы между количественными и качественными признаками провести нельзя. Например, Мендель использовал такой признак у гороха, как рост, и его альтернативные варианты — карликовость и высокий рост. В то же время высота растения зависит от многих генов.

С другой стороны, признак окраски глаз у дрозофилы, проявляющийся на морфологическом уровне как качественный (есть окраска или нет), на биохимическом может выглядеть как количественный, так как количество пигментов у разных особей может плавно изменяться.

При скрещивании особей, различающихся по количественному признаку, в F_1, как правило, не наблюдается доминирования признака одного из родителей, а в F_2 нет четкого расщепления на небольшое число фенотипических классов. Связано это с тем, что проявление количественных признаков (в отличие от качественных) обусловлено суммарным действием большого числа пар генов, как это наблюдается в случае полимерии. При этом число фено-

Рисунок 2.7



Наследование длины початка кукурузы при скрещивании длиннопочаткового сорта «Черный мексиканец» (справа) с короткопочатковым сортом «Мальчик-с-пальчик» (слева) [Emerson, East, 1913. — Из: King, Stansfield, 1997]

типических классов возрастает с увеличением числа пар генов, влияющих на развитие данного признака (рис. 2.6). При участии в скрещивании одной пары генов в F_2 получается три генотипические комбинации, двух — 5 комбинаций, трех — 7 комбинаций, при участии многих пар генов получается плавная кривая распределения.

В закономерностях наследования количественных признаков, по мнению П. Ф. Рокицкого [1978], можно выделить следующие особенности:

1. Кривая распределения особей F_1 обычно располагается между кривыми распределения родительских форм (рис. 2.7). Средняя арифметическая признака в F_1 чаще всего промежуточная между средними арифметическими у родительских форм.

2. Средняя арифметическая значений в F_2 примерно равна средней арифметической в F_1, но вариация особей значительно выше.

3. Кривые распределения особей из возвратных скрещиваний F_1 с каждым из родителей сдвинуты ближе к кривым распределения родительских форм.

Литература

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 47–78.

Вилли К. Биология. М.: Мир, 1966. С. 479–508.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 82–98.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 101–169, 465–480.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 62–75, 125–161.

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 116–201.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.; Петроград: Госиздат, 1923. 71 с.

Мюнтцинг А. Генетика общая и прикладная. М.: Мир, 1967. С. 125–139, 166–177.

Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Вышейш. шк., 1978. 447 с.

Синнот Э., Дэнн Л. Курс генетики. Теория и задачи. М.; Л.: Гос. изд-во биол. мед. лит., 1934. С. 55–120.

King R., Stansfield W. D. A dictionary of genetics. 5th ed. New York; Oxford: Oxford University Press, 1997. 283 p.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 46–114.

Глава 3

МОРГАНИЗМ — ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

3.1. НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ПОЛОМ

Г. Мендель подчеркивал, что направление скрещивания, т. е. то, от какого пола привносятся доминантные или рецессивные признаки, не имеет значения для расщепления признаков у гибрида. Это правильно для всех случаев, когда гены находятся в аутосомах, одинаково представленных у обоих полов.

Наследование признаков, гены которых находятся в половых хромосомах, называется наследованием, сцепленным с полом.

Т. Морган и его сотрудники провели два типа скрещиваний дрозофил: в одном самки были нормальными по цвету глаз (w^+), а самцы имели белые глаза (w), в другом белоглазых самок (w) скрещивали с нормальными самцами (w^+). Такие скрещивания называют реципрокными, т. е. проведенными в обоих направлениях. В скрещивании нормальных самок с белоглазыми самцами

P w^+w^+ × ♂ wY

↓

F_1 ♀ w^+w × ♂ w^+Y

↓

F_2 w^+w^+ ww^+ ♂ w^+Y wY

1 : 1 : 1 : 1

красные белые

все самцы и самки первого поколения были красноглазыми. Во втором поколении все самки были красноглазыми, а самцы — как красноглазыми, так и белоглазыми в соотношении 1 : 1.

Дополнение 3.1

Группа основоположников хромосомной теории наследственности, а затем и многих других направлений современной генетики, сложилась в Колумбийском университете под руководством Т. Моргана.

В 1904 г. великий цитолог того времени Э. Вильсон (E. Wilson) пригласил Моргана, уже известного морфолога и эмбриолога, занять место профессора на кафедре зоологии Колумбийского университета. Осенью 1909 г., когда Морган читал курс введения в биологию, единственный раз за всю свою научную карьеру, на лекциях присутствовали второкурсник А. Стёртевант и первокурсник К. Бриджес. С самого начала оба студента были заинтригованы стилем преподавателя. Морган не был очень хорошим лектором в обычном смысле этого слова, да и лекции были не всегда хорошо продуманы, спланированы или выдержаны логически, как, например, у самого Вильсона. Однако студенты, обладавшие природным любопытством, ощущали в этих лекциях дух открытий и постановки новых проблем. По иронии судьбы Морган в том курсе не говорил о проблемах наследственности. Тем не менее осенью 1910 г. оба студента попросились на кафедру Моргана. Стёртевант, как третьекурсник, был принят ассистентом, а Бриджесу предложили мыть бутылки, в которых разводили дрозофил. Двумя годами позже в группу вошел Г. Мёллер.

После 1910 г. через лабораторию Моргана прошли многие исследователи, в том числе Ч. Зелены (C. Zeleny), Ф. Пэйн (F. Payne), Ч. Метц (C. Metz), Х. Пло (H. Plough), Д. Лейнсфилд (D. Lancefield), А. Уэйнстайн (A. Weinstein), Л. Дэнн (L. Dunn), Ф. Шрэдер (F. Schrader), Ф. Добржанский (T. Dobzhansky), О. Мор (O. Mohr). Хотя все они внесли свой существенный вклад в развитие того или иного раздела генетики, именно Бриджес, Мёллер и Стёртевант участвовали в наиболее результативных экспериментах 1910–1915 гг., в которых и были заложены начала хромосомной теории наследственности. В отличие от Моргана и Стёртеванта, Бриджес активно интересовался политикой, например, он поддерживал большевистскую революцию 1917 г. в России или повстанцев-республиканцев во время гражданской войны в Испании в 1936 г. Он был приглашен Академией наук СССР и провел в СССР один год (1931–1932).

Г. Мёллер так же, как и Бриджес, интересовался политикой и поддерживал левых. Три года (1933–1936) он провел в СССР, куда приехал по приглашению Н. И. Вавилова. Затем переехал в Испанию, помогая повстанцам. Его активность по распространению газет левых общественных движений была одной из причин ухода из Техасского университета в 1933 г. [Allen, 1978, стр. 164–171].

Расщепление 3 : 1 получается, но своеобразное: самки все одного фенотипа, а самцы — двух.

В случае реципрокного скрещивания, когда самка, гомозиготная по гену *w* (белые глаза), скрещивается с красноглазым самцом, расщепление по цвету глаз наблюдается в первом же поколении в соотношении 1 : 1:

P $ww \times$ ♂ w^+Y

↓

F_1 ♀ $ww^+ \times$ ♂ wY

↓

F_2 ♀ ww w^+w ♂ wY w^+Y

1 : 1 : 1 : 1

белые красные белые красные

При этом белоглазыми оказываются только самцы, а все самки — красноглазые. В F_2 и самки, и самцы представлены и белоглазыми, и красноглазыми особями в равных долях.

Картина наследования, когда в F_1 признаки родителей передаются противоположному полу, называется крисс-кросс (criss-cross — крест-накрест).

Эти расщепления полностью коррелируют с поведением половых хромосом. Именно в этом эксперименте была впервые показана генетическим методом роль хромосом в наследственности.

Рисунок 3.1

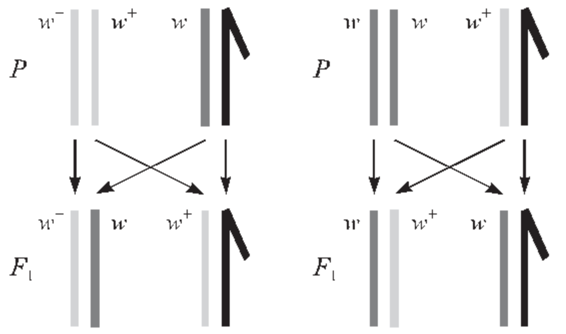


Схема передачи *X*-хромосомы от самки самцу и наследование крисс-кросс

В самом деле, если самка является гомозиготной по доминантному гену красной окраски глаз (рис. 3.1), находящемуся в *X*-хромосоме, то этот ген передается сыновьям F_1. В результате все они имеют нормальную окраску глаз w^+, и расщепление обнаруживается только в F_2.

В реципрокном скрещивании белоглазая самка передает самцу мутантный ген *w*, и уже в первом поколении наблюдается расщепление по цвету глаз — все самцы белоглазые.

3.2. НЕРАСХОЖДЕНИЕ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ

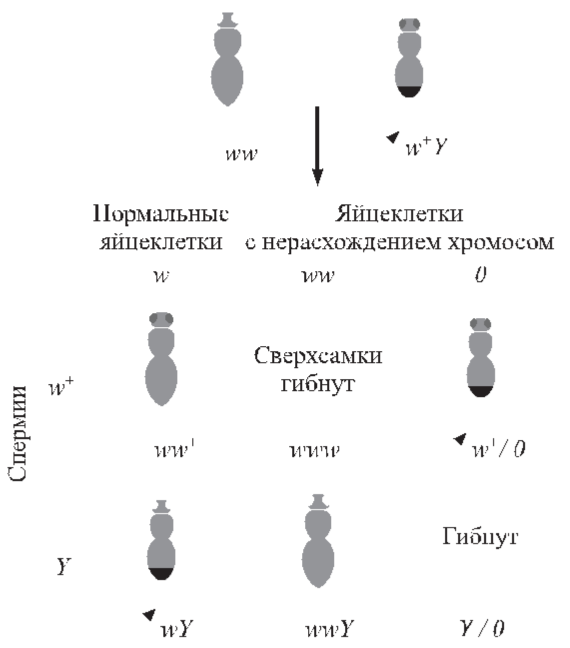
Скрещивание белоглазой самки дрозофилы с красноглазым самцом дает в первом поколении белоглазых самцов и красноглазых самок. Однако иногда в таком скрещивании с частотой 0,001–0,1 % появляются красноглазые самцы и белоглазые самки.

К. Бриджес, описавший это явление в 1913 г., предположил, что во время мейоза в направительное тело отходят обе *X*-хромосомы, а в яйцеклетку — ни одной. Если в направительное тело *X*-хромосомы не отходят, обе они будут находиться в яйцеклетке. Это явление было названо первичным нерасхождением хромосом (рис. 3.2).

Получающиеся после оплодотворения самки с тремя *X*-хромосомами гибнут на личиночной стадии развития, особи, имеющие только *Y*-хромосому, тоже гибнут, а самцы с только *X*-хромосомой внешне нормальны, но стерильны. Данные по нерасхождению хромосом свидетельствуют о том, что нарушения в распределении половых хромосом сопровождаются изменениями в наследовании признаков, сцепленных с полом.

Особый случай 100%-го нерасхождения хромосом был описан Л. В. Морган. При скрещивании самки дрозофилы, имевшей желтое тело (мутация *yellow* — *y*), с самцом, имевшим серую окраску тела (y^+), в потомстве все сыновья оказались с отцовским признаком, а дочери — с материнским, что означало явное отклонение от правила крисс-кросс. Как оказалось, в этом случае обе *X*-хромосомы, несущие гены *y*, соединены в своей проксимальной части и имеют общую центромеру. Эти *X*-хромосомы ведут себя как одна и постоянно отходят либо в яйцеклетку, либо в направительное тело вместе. Такие *X*-хромосомы называют сцепленными. Кроме того, самка имеет еще *Y*-хромосому, полученную от самца. Линия со сцепленными *X*-хромосомами *XX* очень удобна для размножения точной копии единственной *X*-хромосомы самца и ее длительного сохранения (рис. 3.3). В ней выживают лишь особи, имеющие генотипы, соответствующие родительским, т. е. линия постоянно воспроизводится. При этом все самцы-потомки имеют *X*-хромосому такую же, как у самца-родителя.

Рисунок 3.2



Схема, демонстрирующая нерасхождение *X*-хромосом у *D. melanogaster*

Рисунок 3.3

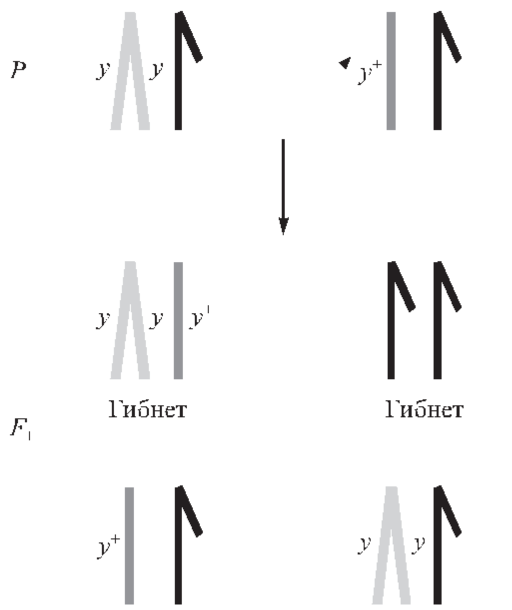


Схема скрещивания для поддержания линии со сцепленными *X*-хромосомами у самки и *X*-хромосомы у самца *D. melanogaster*

3.3. СЦЕПЛЕННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ И КРОССИНГОВЕР

3.3.1. Сцепленное наследование

В 1906 г. У. Бэтсон и Р. Пэннет, изучая наследование окраски цветка (пурпурная — *P* или красная — *p*) и формы пыльцевых зерен (удлиненная — *L* или круглая — *l*) у душистого горошка *Lathyrus odoratus,* нашли, что при скрещивании растений с пурпурными цветками и удлиненной пыльцой (*PPLL*) и растений с красными цветками и круглой пыльцой (*ppll*) в F_1 были получены растения с пурпурными цветками и удлиненной пыльцой *PpLl*. Эти гибриды в результате самоопыления дали следующее расщепление в F_2:

пурпурные цветки и удлиненная пыльца
P–L– — 4831 (69,5 %)
пурпурные цветки, круглая пыльца
P–ll — 390 (5,6 %)
красные цветки, удлиненная пыльца
ppL– — 393 (5,6 %)
красные цветки, круглая пыльца
ppll — 1338 (19,3 %)

То есть в потомстве получены все четыре ожидаемых класса, но соотношение было не 9 : 3 : 3 : 1. В этом случае родительские сочетания аллелей исследованных генов *PL* и *pl* предпочтительно попадают в исходные гаметы, в то время как их новые сочетания (*pL* и *Pl*) встречаются гораздо реже. Это явление в дальнейшем назвали сцеплением генов.

Сцепленное наследование подробно изучили Т. Морган, А. Стёртевант, Г. Мёллер и К. Бриджес.

В скрещиваниях родительских форм, гомозиготных по доминантным аллелям обоих генов и гомозиготных по рецессивным аллелям, получаются гибриды F_1, у которых оба признака будут доминировать.

$$P \quad AABB \times aabb$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad AaBb$$

Структура гамет особей F_1 может быть проверена с помощью анализирующего скрещивания:

$$AaBb \times aabb$$

Если испытуемые гены находятся в разных хромосомах, то образуется 4 вида гамет *AB*, *Ab*, *aB* и *ab* и, следовательно, четыре фенотипических класса потомков:

$$AaBb \quad Aabb \quad aaBb \quad aabb$$

в соотношении 1 : 1 : 1 : 1. Однако если гены *A* и *B* сцеплены и «стремятся» попасть в одну га-

мету, в результате анализирующего скрещивания могут появиться только две формы, повторяющие признаки родителей в равном соотношении:

$$1\ AB/ab : 1\ ab/ab$$

Это означает, что гены A и B наследуются совместно, как единый наследственный фактор, т. е. они «сцеплены» (термин предложен Т. Морганом).

Обнаружение сцепления в наследовании признаков стало еще одним подтверждением идеи о расположении генов в хромосомах.

3.3.2. Кроссинговер

Как и в других законах наследственности, в законе о сцеплении генов сразу же обнаружили исключения. Морган в 1911 г. нашел, что в гомологичной паре хромосом регулярно происходит обмен генами.

В скрещивании организмов, различающихся по паре признаков, в F_1 получаются дигетерозиготы AB/ab.

В скрещивании потомков F_1 с родительской формой ab/ab в случае полного сцепления получалось бы расщепление AB/ab и ab/ab в соотношении 1:1. Однако всегда появляются новые сочетания признаков, например Ab/ab и aB/ab. Значит, во время гаметогенеза образовались новые сорта гамет за счет перекреста хромосом и обмена их фрагментами.

P: $\frac{AB}{AB} \times \frac{ab}{ab}$

F_1: $\frac{AB}{ab} \times \frac{ab}{ab}$

F_2: $\frac{AB}{ab}$ $\frac{ab}{ab}$ — Расщепление при полном сцеплении (1 : 1); $\frac{AB}{ab}$ $\frac{ab}{ab}$ $\frac{Ab}{ab}$ $\frac{aB}{ab}$ — Расщепление при кроссинговере

3.3.2.1. Генетические доказательства перекреста хромосом

Т. Морган с сотрудниками скрещивали мутантные линии дрозофил, содержащие аллели b (черное тело) и vg (зачаточные крылья).

$$\frac{b^+\,vg}{b^+\,vg} \times \frac{b\,vg^+}{b\,vg^+} \rightarrow \frac{b^+\,vg}{b\,vg^+}$$

Далее проводились реципрокные скрещивания: в одном дигетерозиготой была самка, а дигомозиготой — самец, в другом скрещивании — наоборот.

Если дигетерозиготой был самец, в потомстве одна часть имеет фенотип $b^+\,vg$, другая — $b\,vg^+$. Эти классы образуются в соотношении 1 : 1.

$$\frac{b\,vg}{b\,vg} \times \frac{b^+\,vg}{b\,vg^+} \rightarrow \frac{b^+\,vg}{b\,vg} \quad \frac{b\,vg^+}{b\,vg}$$

$$1 : 1$$

В ходе этого эксперимента Морган открыл, что у самцов дрозофилы перекрест хромосом не происходит. Это наблюдение имеет огромное значение для любых экспериментов по генетике дрозофилы, в которых нужно исключить кроссинговер у одного из родителей.

В реципрокном скрещивании получено четыре класса потомков, два из которых имеют сцепленные гены в том порядке, в каком они наблюдались у родителей, а два других класса возникли в результате нарушения сцепления — это кроссоверы:

$$\frac{b^+\,vg}{b\,vg^+} \times \frac{b\,vg}{b\,vg} \rightarrow \underbrace{\frac{b^+\,vg}{b\,vg} \quad \frac{b\,vg^+}{b\,vg}}_{\text{некроссоверы}} \quad \underbrace{\frac{b^+\,vg^+}{b\,vg} \quad \frac{b\,vg}{b\,vg}}_{\text{кроссоверы}}$$

Эти результаты неопровержимо показывают, что в ходе гаметогенеза произошел обмен фрагментами хромосом.

Число мух в классах находилось в определенных соотношениях: $b^+\,vg/b\,vg$ и $b\,vg^+/b\,vg$ составляли по 41,5 %, т. е. некроссоверов было 83 %. Два кроссоверных класса по числу особей были также одинаковыми (8,5 %), и сумма их равна 17 %.

Частота кроссинговера определяется как отношение числа гамет с зарегистрированными обменами между двумя определенными парами аллелей к общему числу гамет.

Частота кроссинговера между двумя генами, выявляемая в опыте, не может быть более 50 %, так как это значение соответствует вероятности нормального, т. е. без кроссинговера, расхождения хромосом.

3.3.2.2. Цитологические доказательства кроссинговера

В начале 30-х гг. К. Штерн получил линии дрозофилы, имеющие половые хромосомы, различимые на цитологическом уровне. У самки на одну из *X*-хромосом был перенесен небольшой фрагмент *Y*-хромосомы, что придало ей специфическую Г-образную форму, легко определяемую под микроскопом. Вторая *X*-хромосома была короче нормальной, так как часть ее была перенесена на четвертую хромосому (рис. 3.4).

Были получены самки, гетерозиготные по двум указанным морфологически различным *X*-хромосомам и одновременно по двум генам *Bar* (*B*) и *carnation* (*car*). Мутанты *Bar* имеют полосковидные глаза, у мутантов *car* глаза цвета красной гвоздики. Г-образная *X*-хромосома несла аллели дикого типа B^+ и car^+, укороченная хромосома — мутантные аллели *B* и *car*.

Этих самок скрещивали с самцами, имевшими морфологически нормальную *X*-хромосому, несущую аллели *car* и B^+.

В потомстве от этого скрещивания было два класса мух с некроссоверными *X*-хромосомами: *car B*/*car* B^+ и car^+ B^+/*car* B^+ и два класса мух, фенотип которых соответствовал кроссоверам: *car* B^+/*car* B^+ и car^+ *B*/*car* B^+.

Рисунок 3.4

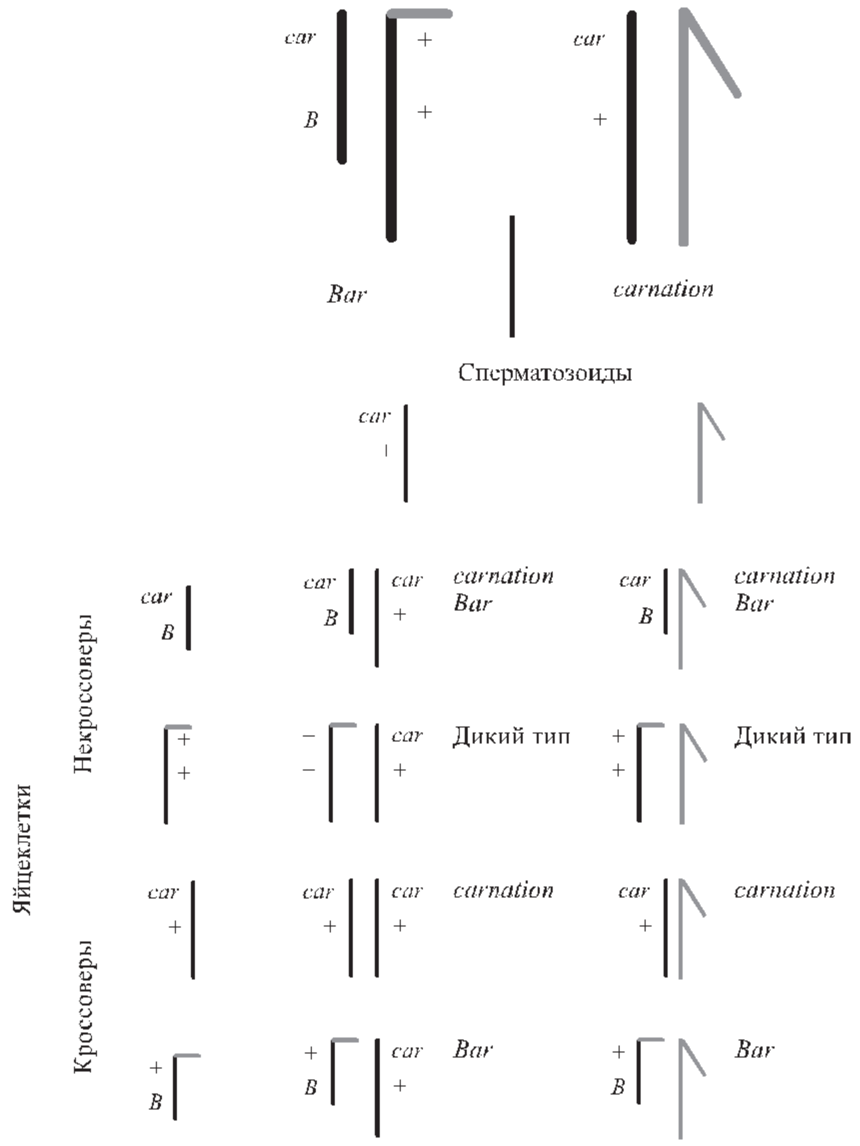


Схема опыта по цитологическому доказательству кроссинговера на *D. melanogaster* [Stern, 1931]

Рисунок 3.5

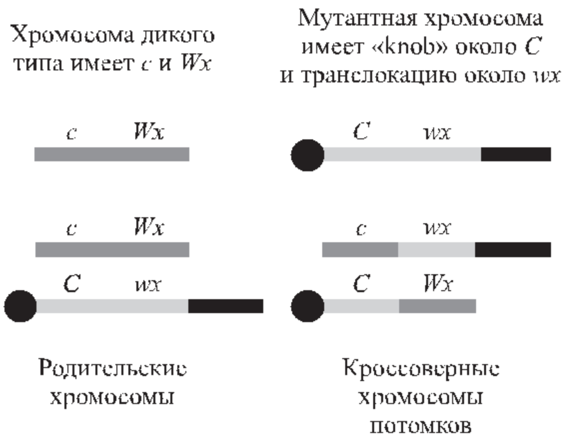


Схема кроссинговера в IX паре хромосом кукурузы в опытах Крейтона и МакКлинток

Цитологический анализ препаратов от 374 самок показал, что в 369 случаях кариотип соответствовал ожидаемому. Все четыре класса самок имели по одной нормальной, т. е. палочковидной, *X*-хромосоме, полученной от отца. Кроссоверные самки с фенотипом car^+ *B* содержали Г-образную *X*-хромосому.

Аналогичные результаты были получены на кукурузе (рис. 3.5). Г. Крейтон и Б. МакКлинток создали линию, в которой хромосомы IX пары оказались цитологически различными (гетероморфными). Одна была нормальной и несла гены *c* (неокрашенный эндосперм) и *Wx* (крахмалистый эндосперм), другая имела утолщение (knob) одного плеча, а второе было длиннее нормального. Эта хромосома была помечена генами *C* (окрашенный эндосперм) и *wx* (восковидный эндосперм).

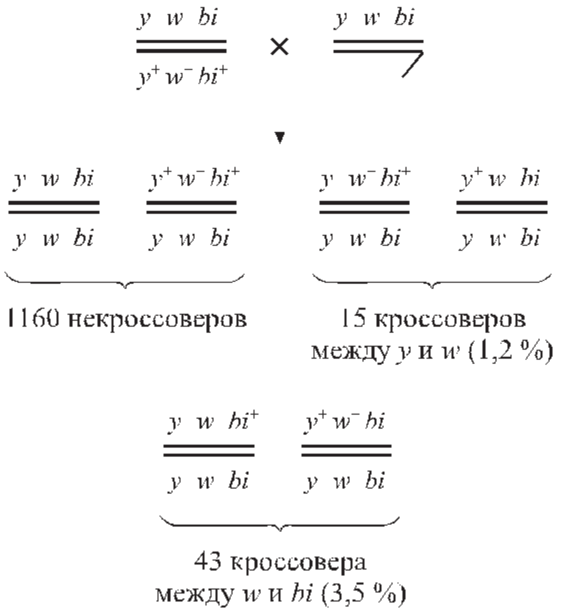
При скрещивании обнаружили, что кроссоверные зерна неизменно содержали IX хромосому с обменявшимися участками: хромосому нормальной длины, но с утолщением или хромосому без утолщения, но удлиненную.

Эти результаты подтвердили представления Т. Моргана и его сотрудников о том, что кроссинговер представляет собой обмен участками гомологичных хромосом и что гены действительно локализованы в хромосомах.

3.3.2.3. Частота кроссинговера и линейное расположение генов в хромосоме

В одном из опытов Морган и его сотрудники проводили скрещивание самок дрозофилы, гетерозиготных по трем сцепленным рецессивным генам: *y* (*yellow* — желтый цвет тела), *w* (*white* — белый цвет глаз) и *bi* (*bifid* — вильчатые крылья), с самцами, несущими эти признаки (*y w bi*). Полученные в опытах Моргана результаты представлены на рис. 3.6.

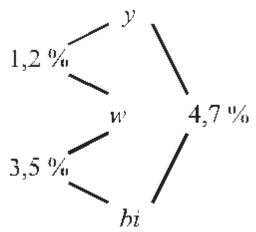
Рисунок 3.6



Частоты кроссинговера между генами *y*, *w* и *bi*

А. Стёртевант предположил, что гены расположены линейно и частота кроссинговера показывает относительное расстояние между генами: чем чаще осуществляется кроссинговер, тем дальше отстоят гены друг от друга в хромосоме. Чем реже кроссинговер, тем они ближе. Таким образом он предложил строить линейные карты расположения генов.

В рассмотренном выше примере расстояние между *y* и *w* может быть выражено значением 1,2 сантиморгана, между *y* и *bi* — 4,7, между *w* и *bi* — 3,5. И расположить эти три гена непротиворечиво можно только в следующем порядке: *y* — *w* — *bi*.



Дополнение 3.2

За заслуги Т. Моргана в формулировании хромосомной теории наследственности в 1933 г. ему была присуждена Нобелевская премия.

Данные о наследовании, сцепленном с полом, о нерасхождении хромосом, о сцепленном наследовании и кроссинговере, наряду с данными о хромосомном определении пола (см. гл. 14) привели к формированию хромосомной теории наследственности. Согласно этой теории, материальной основой сцепления является хромосома. Она представляет собой отдельную физическую единицу, фигурирующую в мейозе. Все гены, находящиеся в одной хромосоме, связаны между собой субстратом хромосомы и расположены в линейном порядке. После проверки всех генов на возможность сцепленного наследования друг с другом у дрозофилы можно выявить группы их сцепления. Число групп сцепления равно гаплоидному числу хромосом.

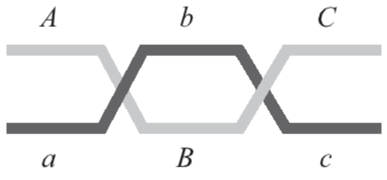
3.3.2.4. Одинарный и множественный перекресты хромосом

Перекрест, происходящий в одном участке хромосомы, называют одинарным, в двух точках — двойным, в трех — тройным, т. е. кроссинговер может быть множественным.

Рассмотрим эту ситуацию на следующем отвлеченном примере (табл. 3.1). Были скрещены особи

$$ABC/abc \times abc/abc.$$

Перекрест происходит в следующих точках между генами A и B, а также B и C:



Если бы считали только одиночные обмены между генами A и C (79 + 135 = 214), расстояние составило бы 41,1 сантиморгана. Однако при построении генетических карт учитываются все события кроссинговера. Между генами A и B произошло 93 обмена (79 + 14),

Таблица 3.1. Расщепления в потомстве тригибридов со сцепленными генами при анализирующем скрещивании [Лобашев, 1967. С. 239]

Гаметы	Генотип зигот	Число особей		%
Некроссоверы				
ABC	*ABC/abc*	150	293	56,2
abc	*abc/abc*	143		
Кроссинговер между *A* и *B*				
Abc	*Abc/abc*	37	79	15,2
aBC	*aBC/abc*	42		
Кроссинговер между *B* и *C*				
ABc	*ABc/abc*	70	135	25,9
abC	*abC/abc*	65		
Кроссинговер между *A* и *B*, между *B* и *C*				
AbC	*AbC/abc*	8	14	2,7
aBc	*aBc/abc*	6		
Всего потомков			521	100

поэтому расстояние между ними составляет 93/521 × 100 = 17,9 %. Считая аналогичным образом, определяем расстояние между B и C — 28,6 %. Таким образом, общее расстояние между A и C должно составлять примерно сумму расстояний между A и B и B и C, т. е. 17,9 + 28,6 = 46,5 сантиморгана. Разница в 5,4 сМ возникает за счет двойного кроссинговера. Дело в том, что на протяженных участках такой кроссинговер очень трудно учитывать. Например, в случае происшедшего двойного кроссинговера между генами A и C оба они останутся на своих местах и факт обмена между ними останется незамеченным:

При этом чем дальше гены отстоят друг от друга, тем больше вероятность двойного кроссинговера, следовательно, чем меньше расстояние между генами, тем оно точнее может быть определено.

Для учета двойных обменов между генами A и C нужно иметь маркер между ними. В нашем примере маркером двойного кроссинговера является ген B. Поэтому к суммарной частоте одиночных кроссоверов (41,1 %) прибавляют удвоенную частоту двойных кроссоверов (2,7 × 2 = 5,4 %), в результате чего получает-

Дополнение 3.3

В 1919 г. Дж. Холдейн предложил расстояние между двумя генными локусами, характеризующееся частотой кроссинговера в 1 %, называть единицей Моргана (m. u. в англоязычной литературе).

В России для обозначения частоты кроссинговера, равной 1 %, использовали термин «морганида». С 80-х гг. почти повсеместно как в русскоязычной, так и в англоязычной литературе используют термин «сантиморган» (сМ, от англ. centiMorgan).

ся общее расстояние 41,1 + 5,4 = 46,5 %. Удвоение доли двойных кроссоверов необходимо в связи с тем, что каждый двойной кроссинговер возникает благодаря двум независимым одиночным разрывам.

3.3.2.5. Интерференция

Установлено, что в опыте доля двойных кроссоверов оказывается ниже теоретически ожидаемой.

Если гены *A*, *B* и *C* (см. табл. 3.1) расположены близко друг к другу, то одиночный обмен на участке между генами *A* и *B* подавляет таковой на участке между генами *B* и *C*. По мере удаления гена *C* возможность второго обмена увеличивается. Интерференция — это явление, сущность которого заключается в том, что кроссинговер, происшедший в одном участке хромосомы, препятствует кроссинговеру в близлежащих участках. Особенно сильно это сказывается, если гены расположены близко друг к другу. Интерференция была открыта Г. Мёллером в 1916 г.

Если кроссинговер в одном участке хромосомы препятствует обмену в другом, то это положительная интерференция. Очень редко интерференция бывает отрицательной, когда кроссинговер усиливается. В примере, приведенном в разд. 3.3.2.4, гены *A* и *B* разделены расстоянием 17,9 сМ, а *B* и *C* — 28,6 сМ. Если обмены на участках *AB* и *BC* происходят как независимые и случайные события, то вероятность двойного кроссинговера между генами *A* и *C* должна соответствовать произведению вероятностей перекреста на участках *AB* (17,9) и *BC* (28,6), т. е. 17,9 × 28,6 = 5,12 %. Однако в опыте получено всего 14 особей (2,7 %). Это снижение происходит за счет интерференции.

Количественно интерференция выражается как отношение наблюдаемого числа двойных обменов к числу теоретически ожидаемых. Это отношение называют коинциденцией, т. е. величиной совпадения; в данном случае 2,7/5,12 = 0,53, или 53 %. На небольшом расстоянии, где имеет место влияние одного гена на другой, величина совпадения будет меньше единицы.

Интерференция является свойством района хромосомы.

3.3.2.6. Неравный кроссинговер

Обычно кроссинговер — очень точный процесс, и основа этого в молекулярной гомологии участков хромосом, вступающих в кроссинговер. В результате происходит обмен равными участками хромосом с равным числом

Рисунок 3.7

Фенотипы мух дикого типа (*а*) и с мутациями *B* (*б*) и *BB* (*в*)

генов. В редких случаях наблюдаются разрывы не в тождественных участках — это неравный кроссинговер.

Глаза дрозофилы дикого типа имеют 800 фасеток, у особей, гетерозиготных по мутации *Bar* (*B*/+), фасеток около 350, у гомозигот *B/B* число фасеток снижается до 70, а у мутанта «двойной *Bar*» (*BB*) — до 50 у гетерозиготы *BB*/+ и до 25 — у гомозиготы *BB/BB* (рис. 3.7).

А. Стёртевант предположил в 1925 г., что фенотипическое проявление гена *B* связано не с нарушением самого гена, а с изменением его дозы путем неравного кроссинговера. В результате скрещивания

$$f^+\ B\ fu^+/\ f\ B\ fu \times f\ B^+\ fu/\ Y$$

были получены, в частности, следующие классы потомков:

— некроссоверные самки: $f^+\ B\ fu^+/f\ B^+\ fu$ и $f\ B\ fu/f\ B^+\ fu$;

— кроссоверные самцы: $f\ B\ fu^+$, $f^+\ B\ fu$;

— некроссоверные самцы: $f^+\ B\ fu^+$ и $f\ B\ fu$;

— самцы «двойной *Bar*»: $f\ BB\ fu^+$ и $f^+\ BB\ fu$;

— мухи с нормальными глазами: $f\ B^+\ fu^+$ или $f^+\ B^+\ fu$.

Последние два класса были немногочисленными.

Стёртевант предположил, что появление мух с фенотипами *BB* или B^+ связано с изменением дозы гена за счет обмена гомологичных хромосом не совсем одинаковыми участками (рис. 3.8).

При образовании кроссоверных гамет происходит увеличение дозы одной части локуса *B* у особей $f^+\ BB\ fu$ и потеря части локуса *B* у кроссоверов $f\ B^+\ fu^+$.

В политенных хромосомах ген *Bar* находится в диске 16А1-2 в хромосомах дикого типа, у мутантов *Bar* этот район хромосомы дуплицирован, а у мутантов *BB* — утроен. Исследователи трех лабораторий установили этот факт независимо друг от друга: Г. Мёллер, А. А. Прокофьева-Бельговская и К. В. Косиков, Е. Н. Волотов, а также К. Бриджес.

Рисунок 3.8

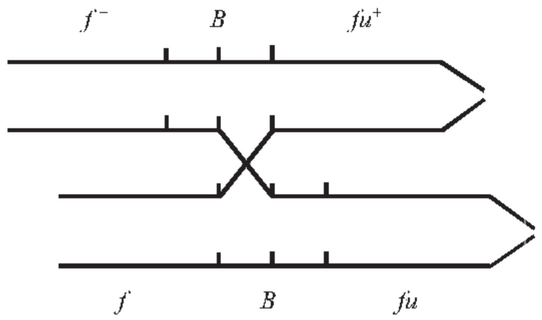


Схема неравного кроссинговера

Таким образом, вследствие неравного кроссинговера участок одной из гомологичных хромосом может удвоиться или утроиться, а в другой теряется фрагмент.

Аналогичное удвоение участка хромосомы было обнаружено у кукурузы.

3.3.2.7. Митотический (соматический) кроссинговер

До сих пор мы рассматривали обмены участками хромосом, происходящие в ходе мейоза. Однако, как выяснилось, кроссинговер может происходить и в соматических клетках в течение клеточного цикла.

Такой кроссинговер может быть обнаружен, если он осуществляется на стадии четырех хроматид (рис. 3.9). При этом в интерфазе гомологичные хромосомы конъюгируют и входят в митотическое деление спаренными.

У самки дрозофилы, гетерозиготной по двум аллелям гена w^+, отвечающего за окраску глаз (w — белые глаза и w^{co} — глаза кораллового цвета), глаза имеют розовый цвет. В клеточном цикле, когда образуются четыре хроматиды, они могут перекрещиваться. Если в это время клетки подвергаются какому-либо сильному воздействию, например облучаются рентгеновскими лучами, может произойти обмен фрагментами несестринских хроматид. В результате в одной из дочерних клеток окажутся две хромосомы с аллелем w, а в другой — две хромосомы с аллелем w^{co} и образуются клетки, генотипы которых различаются. На фоне общего розового цвета глаз, характерного для гетерозигот w/w^{co}, появляется одна клетка белого цвета и одна темно-красного. Две клетки, возникшие как следствие одного митоза, при последующем размножении дадут два вида пятен, примерно равных по размеру и проявляющих два разных рецессивных признака. Наличие таких пятен свидетельствует о происшедшем митотическом кроссинговере.

3.3.2.8. Факторы, влияющие на кроссинговер

Кроссинговер обнаружен почти у всех изученных видов животных и растений [см. более подробно: Лобашев, 1967. С. 277–283], однако формирование обменов хромосом зависит от пола, например, у самцов дрозофилы и самок шелкопряда (оба пола гетерогаметные) кроссинговер не происходит. Общая частота может быть различной в ооцитах и спермиях. У человека рекомбинация происходит в два раза чаще у женщин, чем у мужчин.

На частоту кроссинговера влияют внешние условия (температура и др.), стадии развития (возраст), пол, генотип (определенные гены или структурные изменения хромосом).

Рисунок 3.9

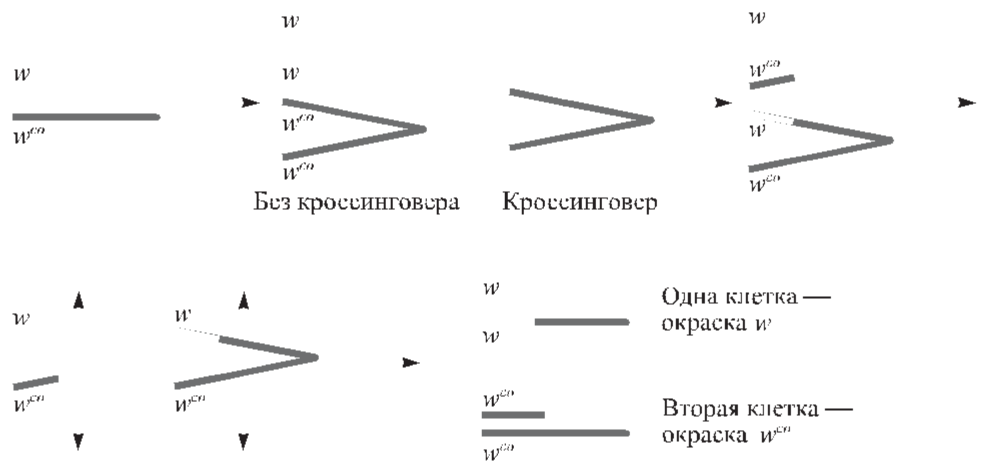
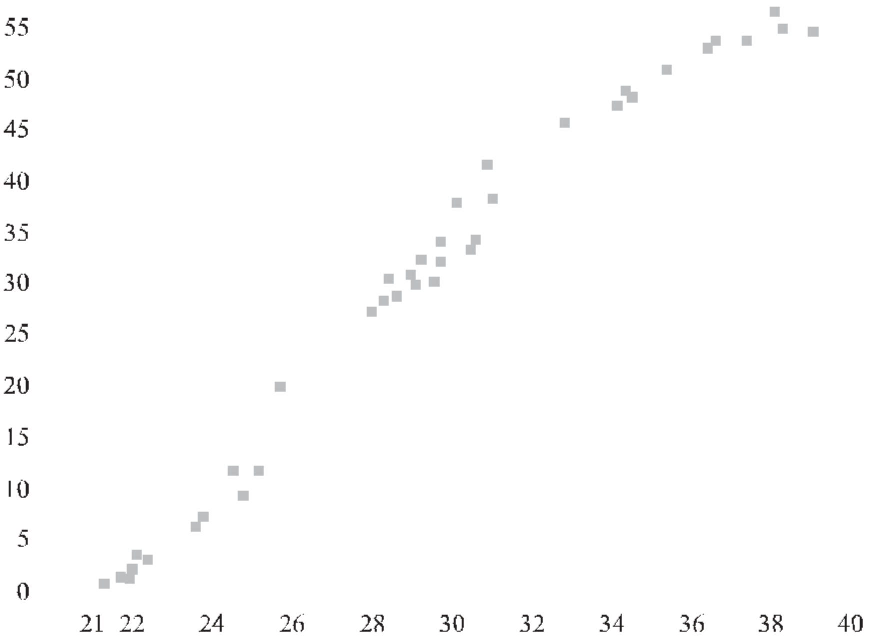


Схема митотического кроссинговера

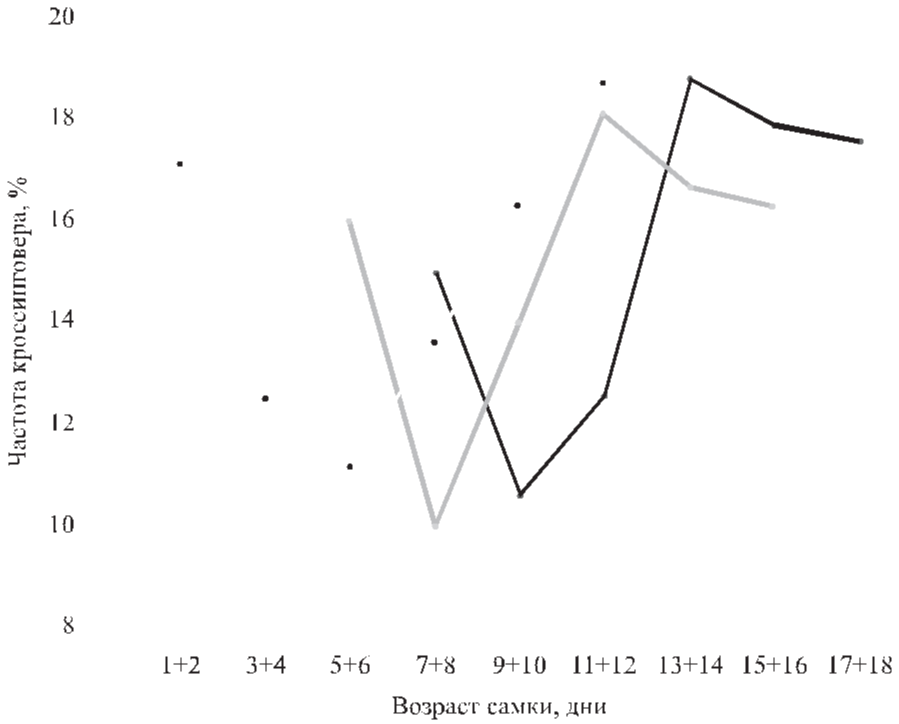
Рисунок 3.10



Кривая, характеризующая частоты кроссинговера в левом плече второй хромосомы *D. melanogaster* [Ashburner, 1989. P. 454].

По оси абсцисс — положение локуса на цитологической карте политенных хромосом, по оси ординат — положение локуса на генетической карте, сМ

Рисунок 3.11



Влияние возраста самки на частоту кроссинговера между генами *st* и *Sb* у дрозофилы [Ashburner, 1989. P. 460].

Самок скрещивали с самцами сразу после вылупления (белый), через 5–6 дней (серый) или более чем через 6 дней (черный)

Увеличение частоты кроссинговера на 2–3 % у самок дрозофилы обеспечивает дополнительная *Y*-хромосома [Ashburner, 1989].

Вдоль хромосомы частоты генетической рекомбинации распределяются нелинейно, исключая средние части плеч хромосом (рис. 3.10), в то же время кроссинговер подавляется в окрестностях гетерохроматина, т. е. общая организация хромосомы сильно влияет на общую частоту обменов. Частота кроссинговера у самки дрозофилы зависит также от ее возраста (рис. 3.11).

В значительной степени частота обменов определяется температурой. Так, у дрозофилы в интервале *b–pr* при 13 °С происходит 13,53 % обменов, при 22 °С — 6,4 %, при 32 °С — 15,79 %.

Острое воздействие высокой температурой, например тепловой шок при 35 °С на стадии куколки дрозофилы в возрасте 12 ч, приводит к огромному увеличению частоты обменов. На участке между генами *lt* и *stw* при 25 °С, т. е. при нормальной для дрозофилы температуре, выявлена низкая частота обменов — 0,05 %. После теплового шока она возрастает более чем в 30 раз (достигает 1,7 %).

Обнаружены и другие факторы, влияющие на частоту перекреста, такие как дополнительные хромосомы в геноме, хромосомные перестройки и т. д. [см. подробнее: Ashburner, 1989. P. 454–460].

Литература

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3 т. Т. 1. М.: Мир, 1987. С. 64–88.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 125–161.

Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука, 1985. 400 с.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 85–111.

Кушев В. В. Механизмы генетической рекомбинации. Л.: Наука, 1971. 97 с.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 116–283.

Синнот Э., Дэнн Л. Курс генетики: Теория и задачи. М.; Л.: Гос. изд-во биол. мед. лит., 1934. С. 148–182.

Чадов Б. Ф., Бузыканова Г. Н. Механизм хромосомной интерференции // Докл. АН. 1996. Т. 348. С. 407–409.

Allen G. E. Thomas Hunt Morgan. The man and his science. Princeton: Princeton University Press, 1978. P. 70–71, 164–173.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 54–471.

Stern C. Zytologisch-genetische Untersuchungen als Beweise fur die Morganische Theorie des Faktorenaustauschs // Biol. Zentralbl. 1931. T. 51. P. 547–587.

Глава 4
ИЗМЕНЧИВОСТЬ НАСЛЕДСТВЕННОГО МАТЕРИАЛА

Изменчивостью называют различия между особями, принадлежащими к одной и той же группе, а также отличия одной особи от других того же вида, которые не могут быть приписаны различиям в возрасте, поле и стадии жизненного цикла.

Различают два вида изменчивости: наследственную и ненаследственную. Первая имеет отношение к изменениям в наследственном материале, вторая является результатом реагирования организма на условия окружающей среды.

Наследственную изменчивость подразделяют на мутационную и комбинативную. Первопричиной мутационной изменчивости являются мутации. Их можно определить как наследуемые изменения генетического материала. Изменчивость, вызываемая расщеплением и перекомбинацией мутаций и обусловленная тем, что гены существуют в разных аллельных состояниях, называется комбинативной.

4.1. МУТАЦИОННАЯ ТЕОРИЯ И КЛАССИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ

Мутационная теория зародилась в начале XX в. в работах Г. де Фриза (1901–1903). Суть ее сводится к следующим основным положениям, которые представляют интерес и в наше время:

1. Мутация возникает скачкообразно, без переходов.
2. Образовавшиеся новые формы константны.
3. Мутация является качественным изменением.
4. Мутации разнонаправленны (полезные и вредные).
5. Выявляемость мутаций зависит от размеров выборки изучаемых организмов.
6. Одни и те же мутации могут возникать повторно.

Мутационные изменения чрезвычайно разнообразны. Они могут затрагивать буквально все морфологические, физиологические и биохимические признаки организма, могут вызывать резкие или, наоборот, едва заметные фенотипические отклонения от нормы (рис. 4.1).

Известно много принципов классификации мутаций. Фактически все авторы отмечают, что очень трудно создать хорошую классификацию мутаций и что все существующие классификации очень схематичны.

С. Г. Инге-Вечтомов [1989] предлагает следующие классификации мутаций:

I. По характеру изменения генотипа:

1. Генные мутации, или точечные.
2. Изменения структуры хромосом, или хромосомные перестройки.
3. Изменения числа наборов хромосом.

II. По характеру изменения фенотипа:

1. Летальные.
2. Морфологические.
3. Физиологические.
4. Биохимические.
5. Поведенческие.

III. По проявлению в гетерозиготе:

1. Доминантные.
2. Рецессивные.

IV. По условиям возникновения:

1. Спонтанные, т. е. возникающие без видимых причин или усилий со стороны экспериментатора. Обычно спонтанными называют мутации, причина возникновения которых неизвестна.
2. Индуцированные, т. е. возникшие в результате какого-то воздействия.

V. По степени отклонения от нормального фенотипа.

В 1932 г. Г. Мёллер предложил классифицировать мутации на следующие категории: гипоморфные, аморфные, антиморфные, неоморфные и гиперморфные.

VI. По локализации в клетке:

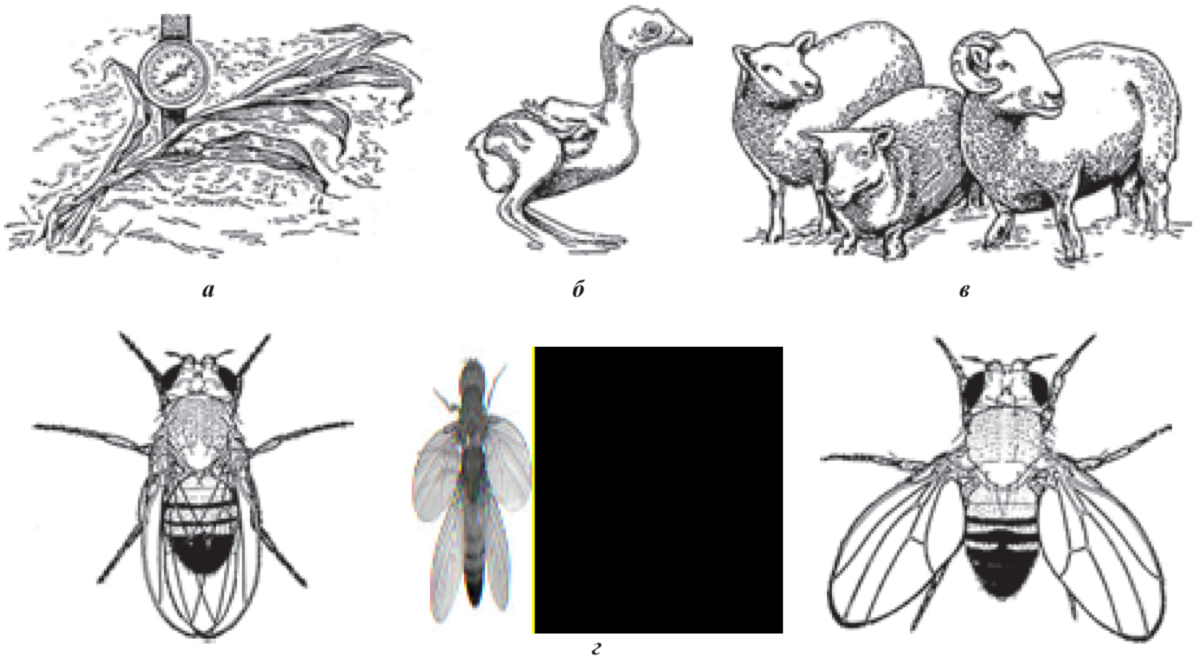
1. Ядерные.
2. Цитоплазматические (мутации внеядерных генов).

VII. По возможности наследования:

1. Генеративные, т. е. индуцированные в половых клетках.
2. Соматические, индуцированные в соматических клетках.

Различают также мутации прямые и обратные.

Рисунок 4.1



Мутации у различных организмов:

а — мутация у кукурузы — «ленивая кукуруза»; *б* — рецессивная, сцепленная с полом мутация отсутствия оперения у курицы; *в* — рецессивная мутация коротконогости у овцы (справа и в центре гомозиготы, слева — гетерозигота) [*а–в* — Лобашев, 1967. С. 291]; *г* — нормальная (слева) и четырехкрылая (мутация гена *BX-C*, в центре) форма дрозофилы (из работы Э. Льюиса), справа — муха с расставленными крыльями (доминантная мутация *Dichaete*)

4.1.1. Закон гомологических рядов наследственной изменчивости Н. И. Вавилова

Первым наиболее серьезным исследованием мутаций была работа Н. И. Вавилова по установлению параллелизма в наследственной изменчивости у видов растений, принадлежащих близким таксонам.

На базе обширных исследований морфологии различных рас растительного мира Вавилов в 1920 г. пришел к выводу, что, несмотря на резко выраженное разнообразие (полиморфизм) многих видов, можно заметить ряд закономерностей в их изменчивости. Если взять для примера семейство злаков и рассмотреть варьирование некоторых признаков, то окажется, что одинаковые отклонения присущи всем видам (табл. 4.1). В данной таблице представлена очень незначительная часть данных Вавилова, легших в основу формулирования закона гомологических рядов в наследственной изменчивости, однако и эти данные позволяют увидеть, что варьирование морфологии идет параллельно у разных видов. Чем таксономически ближе рассматриваемые организмы, тем больше сходство в спектрах их изменчивости.

Закон Вавилова гласит: «Виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть нахождение параллельных форм у других видов и родов. Чем ближе генетически расположены в общей системе роды и линнеоны (т. е. виды. — ***И. Ж.***), тем полнее сходство в рядах их изменчивости». Свой закон Н. И. Вавилов выразил формулой:

$$G_1\ (a + b + c.......)$$
$$G_2\ (a + b + c.......)$$
$$G_3\ (a + b + c.......),$$

где G_1, G_2, G_3 — виды, а a, b, c — различные варьирующие признаки.

Закон Вавилова имеет большое теоретическое значение, поскольку из гомологии наследственных изменений у близких видов выводит и гомологию их генов. И в самом деле, когда много лет спустя научились выделять гены и анализировать их молекулярную организацию, оказалось, что и у растений, и у животных из разных таксонов гомологичные функции контролируются генами с гомологичной последовательностью нуклеотидов. Например,

Таблица 4.1. Изменчивость у видов семейства *Graminidae* (по Н. И. Вавилову)

Наследственно варьирующие признаки	Наличие (+) или отсутствие (–) признака у видов						
	Secale cereale	*Triticum sativum*	*Hordeum sativum*	*Panicum miliaceum*	*Zea mays*	*Oriza sativa*	*Agropyron repens*
Колоски осыпающиеся	+	+	+	+	+	+	
Колоски неосыпающиеся	+	+	+	+	+	+	+
Зерно пленчатое	+	+	+	+	+	+	+
Зерно голое	+	+	+	+	+	+	–
Однополые растения	+	–	–	–	+	–	–
Обоеполые растения	+	+	+	+	+	+	+
Колоски остистые	+	+	+	–	–	+	+
Колоски безостые	+	+	+	+	+	+	+
Цветки одноцветковые	+	+	+	+	+	+	–
Зерно белое	+	+	+	+	+	+	–
Зерно красное	+	+	+	–	+	+	+
Зерно фиолетовое	+	+	+	–	+	+	+
Зерно стекловидное	+	+	+	+	+	+	+
Зерно восковидное	–	(+)	+	+	+	+	–

было показано, что карликовость у арабидопсиса, пшеницы, риса и кукурузы формируется в результате мутаций гомологичных генов. У белка кукурузы, кодируемого геном *d8*, и белков пшеницы, кодируемых генами *Rht–Bla* и *Rht–Dla*, 89 % последовательностей аминокислот идентичны. И такая молекулярная гомология генов и кодируемых ими белков является правилом.

Для селекционной практики этот закон важен потому, что прогнозирует возможность найти неизвестные формы растений у данного вида, если они уже известны у других видов.

Н. И. Вавилов положил закон гомологических рядов в наследственной изменчивости в основу поиска новых форм растений. Под его руководством были организованы многочисленные экспедиции по всему миру. Из разных стран были привезены сотни тысяч образцов семян культурных растений, составивших основу коллекций Всесоюзного института растениеводства (ВИР). Мутантные линии являются важнейшим исходным материалом при создании сортов культурных растений (см. дополнение 4.1).

4.1.2. Классификация мутаций Г. Мёллера

По степени отклонения от нормального фенотипа Мёллер предложил выделить, как уже отмечалось выше, гипоморфные, аморфные, антиморфные, неоморфные и гиперморфные мутации. Рассмотрим эту классификацию.

При *гипоморфных* мутациях измененные аллели действуют в том же направлении, что и аллель дикого типа, но дают ослабленный эффект. Например, особи с двумя летальными мутациями в гомозиготе выживают, но гемизиготы (особи, у которых одна хромосома несет мутацию, а вторая отсутствует) гибнут. Увеличение дозы мутантного гена в этом случае ведет к восстановлению признака дикого типа. Гипоморфная мутация w^e (*white eozine*) в одной или двух дозах дает мутантный фенотип, в трех — почти нормальный.

$$w^e \quad < \quad w^e w^e \quad < \quad w^e w^e w^e$$

Мутантный   Почти дикий тип

Аморфные мутации выглядят как потеря гена. Характерным примером является аморфная мутация *w*. Мутанты демонстрируют четкий фенотип независимо от дозы мутантного аллеля (при отсутствии нормального) и внешних условий. Фенотип — белые глаза — обусловлен полной потерей функции гена, который контролирует транспорт пигмента в клетки глаза.

Антиморфные мутации изменяют фенотип дикого типа на противоположный. Например, у кукурузы ген *A* (дикий тип) обеспечивает пурпурный цвет растений и семян из-за наличия антоциана. Его аллель A^{br} (слабая пурпурная окраска) действует как гипоморф, ослабляя окраску, свойственную дикому типу. Аллель a^p (антиморф) действует в противоположном направлении из-за формирования бурой окраски и блокирования образования антоцианов.

Неоморфные мутации — фенотип мутантов совершенно отличен от дикого. Например,

Дополнение 4.1

Бюро по прикладной ботанике (будущий Всесоюзный институт растениеводства — ВИР) было основано в 1894 г. директором Петербургского ботанического сада проф. А. Ф. Баталиным (1847–1896). Наибольшей известности и размаха работ ВИР достиг при своем пятом директоре — Н. И. Вавилове. При нем было проведено 164 экспедиции (в том числе 20 зарубежных) для сбора растительного материала [Щербаков, Чикова, 1970, 1971]. Из них в 8 зарубежных и 4 по территории СССР принял непосредственное участие Николай Иванович. С 1954 г. (год возобновления поездок за рубеж) по 1994 г. было осуществлено 140 зарубежных командировок, связанных со сбором новых образцов [Щербаков, 1969; Витковский, Чувашина, 1987].

Культуры	Число образцов, хранившихся в ВИРе			
	1915[а]	1966[б]	1968[в]	1983[а]
Ячмень	2989			20681
Пшеница	4288			71732
Тритикале*	—	39343	39947	5551
Рожь	408			2870
Овес	1141			12136
Кукуруза	320			18268
Сорго		29721	22613	11700
Крупяные				21572
Зернобобовые	241	19621	22613	35863
Кормовые	531	11804	10065	21915
Технические	885	15162	15603	22527
Клубнеплоды	—	3845	4300	10334
Овощные	—	16670	29740	29734
Бахчевые	—			9337
Плодовые, ягодные, субтропические и декоративные	913	20912	32588	31983
Сорные растения	1175**	—	—	—

[а] [Витковский, Чувашина, 1987];
[б] [Брежнев, 1968];
[в] [Щербаков, 1969].
* Вторичный генофонд.
** Единственная в мире коллекция сорных растений в настоящее время утеряна.

В конце 1940 г., после ареста Н. И. Вавилова, возглавляемый им ВИР был практически закрыт, и хранившиеся в нем коллекции оказались бесхозными. Тем не менее их уникальность и значение были велики. Немцы, неожиданно заняв Пушкин — пригород Ленинграда, где находились Центральная селекционно-генетическая станция ВИРа и экспериментальные посевы образцов, немедленно собрали попавших в оккупацию сотрудников ВИРа и заставили их восстановить полевые журналы, а также убрать и обмолотить растения [Яковлева и др., 1994]. После этого семена были вывезены в Германию.

Другая судьба была у семян, хранившихся в закрытом ВИРе. Когда в блокированном городе начался голод, возникла реальная угроза, что коллекции будут разворованы или съедены крысами. Тогда группа бывших сотрудников проникла в Институт, чтобы охранять семена. Вокруг страшный голод, сотни тысяч смертей, а группа голодающих людей охраняет семена, которые можно было съесть и таким образом спастись. Более того, каждое блокадное лето в пригородах Ленинграда, в прифронтовой полосе, пересевали уникальные коллекции клубнеплодов, которые не могли выдержать длительного хранения. За время блокады умерли от голода 14 сотрудников ВИРа, спасавших коллекции [Витковский, Чувашина, 1987]. Это один из ярчайших подвигов во время Великой Отечественной войны, совершенных безоружными людьми, пример патриотизма и беззаветного служения науке.

Литература

Брежнев Д. Д. Использование мировых растительных ресурсов в селекции с.-х. культур // Труды по прикл. ботан., генет. и сел. 1968. Т. 39, № 1. С. 42–64.

Витковский В. Л., Чувашина Н. П. Уникальная коллекция // Природа. 1987. № 10. С. 75–87.

Щербаков Ю. Н. Экспедиции Института по СССР и в зарубежные страны // Труды по прикл. ботан., генет. и сел. 1969. Т. 40, № 2. С. 3–19.

Щербаков Ю. Н., Чикова В. А. Зарубежные экспедиции ВИРа по сбору растительных ресурсов // Там же. 1970. Т. 42, № 2. С. 316–320.

Щербаков Ю. Н., Чикова В. А. Экспедиции Института по СССР // Там же. 1971. Т. 45, № 2. С. 299–320.

Яковлева М. А., Лассан Т. К., Филатенко А. А. Николаенко Евдокия Ивановна // Соратники Николая Ивановича Вавилова: Исследователи генофонда растений. СПб., 1994. С. 392–398.

мутация *Antp* у дрозофилы приводит к формированию ноги на голове — на месте антенны.

Гиперморфные мутации — у этих мутантов количество биохимического продукта резко увеличивается.

w^+	→	w^e	→	w^{re}
Красный глаз		Глаз цвета эозина		Темно-красный глаз

4.1.3. Генеративные и соматические мутации

Мутации могут возникать в любой клетке многоклеточного организма. Те из них, которые возникают в клетках зародышевого пути, называются генеративными. Мутации, возникающие в других клетках, называют соматическими.

Генеративная мутация может возникнуть на любом этапе развития половых клеток. Если это происходит на ранних стадиях, она размножится так, что число мутантных клеток будет пропорционально числу клеточных делений после появления мутации. В результате она будет представлена многими копиями, которые в совокупности называют пучком мутаций. Мутации, возникшие на последних этапах развития половых клеток, в спермиях и яйцеклетках, только в этих клетках и представлены. В случае соматической мутации проявление мутантного фенотипа также сильно зависит от стадии, на которой она произошла. Чем раньше мутация возникает, тем больше клеток ее несут.

Соматические и генеративные мутации различаются главным образом возможностью наследования: генеративные всегда передаются по наследству. У соматических мутаций две судьбы:

а) они не играют роли в наследственности, если организм размножается исключительно половым путем и клетки зародышевого пути уже на ранних этапах развития обособляются от соматических;

б) они могут передаваться потомству, если организм может размножаться бесполым путем, например, при вегетативном размножении у картофеля.

Для растений, у которых из соматических клеток впоследствии развивается почка, дающая цветок, соматические мутации имеют огромное значение.

Соматические мутации могут вызывать злокачественные опухоли у человека и животных. Не исключено, что соматические мутации имеют также отношение к процессам старения, так как с возрастом может происходить накопление физиологических мутаций.

4.1.4. Прямые и обратные мутации

Обычно мутации, вызывающие изменения от дикого типа к новому, называют прямыми, а от мутантного к дикому — обратными.

Прямые и обратные мутации возникают с разной частотой. Например, аморфные мутации не дают реверсий к норме. Такие мутации, возможно, связаны с серьезными повреждениями или делецией гена. Возникновение обратных мутаций свидетельствует о том, что при прямом мутировании ген не потерян, а произошло лишь его изменение.

4.1.5. Плейотропный эффект мутаций

Большинство мутаций затрагивает в той или иной степени развитие многих признаков. Такое множественное проявление мутации носит название плейотропии и характерно для большинства генов. Это легко объяснимо, так как продукт фактически каждого гена используется чаще всего в нескольких, а иногда в очень многих или даже во всех переплетающихся друг с другом процессах роста и развития.

Так, для людей, страдающих арахнодактилией, вызываемой доминантной мутацией, типичны изменения пальцев рук и ног, но наблюдаются также вывихи хрусталика глаза и врожденные пороки сердца.

Такое заболевание, как галактоземия, обусловлено рецессивной мутацией гена, кодирующего галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу — один из ферментов, необходимых для усвоения клетками молочного сахара, и ведет к слабоумию, циррозу печени и слепоте. Если больного галактоземией младенца сразу же перевести на искусственную диету, не содержащую молочного сахара, он будет иметь нормальный фенотип.

У крыс описано плейотропное проявление летальной мутации, приводящей к различным патологическим изменениям (рис. 4.2). На первый взгляд, большинство из них не имеют ничего общего друг с другом. Однако, как выяснилось, все они являются следствием одной и той же причины: мутация нарушила развитие хрящей.

4.1.6. Экспрессивность и пенетрантность мутаций

Оба понятия были введены в 1926 г. О. Фохтом (O. Vogt) для описания варьирования мутантных фенотипов.

Пенетрантностью называют частоту или вероятность проявления мутантного фенотипа среди всех особей, несущих данную мутацию.

Рисунок 4.2

Плейотропное проявление одной из летальных мутаций у крысы [Гершензон, 1983. С. 394]

Например, 100 %-я пенетрантность рецессивной мутации означает, что у всех гомозиготных особей она проявилась в фенотипе. Если же фенотипически она обнаруживается только у половины особей, а у второй половины фенотип соответствует нормальному, можно считать, что мутация характеризуется 50 %-й пенетрантностью.

Степень проявления варьирующего мутантного признака в фенотипе называется экспрессивностью мутации. Например, мутация *eyeless* у дрозофилы вызывает редукцию глаза, степень которой неодинакова у разных особей (рис. 4.3).

4.1.7. Множественные аллели

Один и тот же ген может мутировать во множество состояний: до нескольких десятков и более. Например, у дрозофилы известно около 150 аллелей гена *vermilion (v)* и около 350 аллелей гена *white* (*w*). При этом все мутанты

Рисунок 4.3

Варьирование проявления мутации *eyeless* у дрозофилы:
а — нормальный глаз; *б–д* — различная степень редукции глаза у мутантов [Гершензон, 1983. С. 411]

по гену *v* имеют очень похожие, хотя и не совсем одинаковые фенотипы. Фенотипы же мутантов гена *white* варьируют в очень широких пределах: от нормального красного цвета глаз до полного отсутствия пигмента:

w^{+}	красные глаза (дикий тип)
w^{Rr}	цвет, как у дикого типа, — красный
w^{co}	коралловый
w^{bl}	цвет крови
w^{ch}	цвет вишни
w^{bf}	темно-желтый
w^{h}	цвет меда
w^{a}	абрикосовый
w^{p}	пурпурный
w^{e}	эозиновый
w^{i}	цвет слоновой кости
w^{z}	лимонно-желтый
w^{sp}	мозаичный
w^{1}	белый

Разные мутации одного и того же локуса называют серией множественных аллелей, а само явление — множественным аллелизмом. Генотип, гетерозиготный по двум мутантным аллелям одного и того же локуса, называют компаундом.

Члены серии множественных аллелей не только по-разному определяют развитие признаков, но и вступают в разные доминантно-рецессивные отношения друг с другом.

4.1.8. Условные мутации

В ряде случаев мутантный фенотип становится видимым только при выполнении определенных условий.

Температурно-чувствительные мутации. Мутанты этого типа живут и развиваются нормально при одной (пермиссивной) температуре и обнаруживают отклонения при другой (рестриктивной). Например, мутация *shibire* у дрозофилы. При 22 °С мутанты не проявляют каких-либо дефектов, при 29 °С у них наступает полный паралич. Полагают, что в результате мутации происходит замена аминокислоты в молекуле белка, однако при одной температуре эта замена на конформации молекулы не сказывается, а при другой конформация белка меняется и он не выполняет нормальных функций. Выделяют холодочувствительные (при 18 °С) *ts*-мутации (temperature sensitive) и теплочувствительные (при 29 °С) *ts*-мутации. При 25 °С, как правило, сохраняется нормальный фенотип.

Мутации чувствительности к стрессу. В данном случае мутанты развиваются и внешне выглядят нормально, если их не подвергнуть каким-либо стрессирующим воздействиям. Так, мутанты *sesB* (stress sensitive) дрозофилы в обычных условиях не проявляют каких-либо отклонений. Если резко встряхнуть пробирку, у мух начинаются судороги и они не способны двигаться.

Ауксотрофные мутации. Обычно бактерий высевают на чашки Петри, содержащие полную среду, в состав которой входят все необходимые для роста питательные вещества. Есть еще минимальная среда, состоящая из агара, воды, сахаров и солей. Нормальные бактерии способны сами синтезировать нужные им сложные органические соединения (витамины, аминокислоты, нуклеотиды) и могут жить на минимальной среде, а некоторые мутантные не могут. Таких мутантов называют ауксотрофными. Они выживают только на полной среде или же на минимальной, но с добавкой нормального продукта того гена, который в данной линии мутировал.

4.2. СПОНТАННЫЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ МУТАЦИИ

4.2.1. Методы учета мутаций

Для учета частоты возникновения или для выявления мутаций используют различные методические приемы. Первые методы были предложены Г. Мёллером для определения частоты образования мутаций у дрозофилы.

Метод *ClB*. Наиболее объективно можно учитывать частоту возникновения рецессивных летальных мутаций, приводящих в гомозиготном состоянии к смерти несущих их особей. Генетическая структура линии *ClB* характеризуется тем, что одна из *X*-хромосом маркирована доминантным геном *Bar* (*B*) и инверсией, названной *C*. Эта инверсия препятствует кроссинговеру и обладает рецессивным летальным эффектом — *l*. Поэтому линия и названа *ClB*.

Самок этой линии-анализатора скрещивают с самцами из исследуемой выборки. Если самцы взяты из природной популяции, то можно оценить частоту возникновения леталей в ней. Или же берут самцов, обработанных мутагеном. В этом случае оценивается частота летальных мутаций, вызванных этим мутагеном. В F_1 отбирают самок *ClB*/+, гетерозиготных по мутации *Bar*, и скрещивают индивидуально (каждую самку в отдельной пробирке) с самцом дикого типа. Если в проверяемой хромосоме нет мутации, то в потомстве будет два класса самок и один класс самцов (B^+), поскольку самцы *ClB* гибнут из-за наличия летали *l*, т. е. общее расщепление по полу будет 2 : 1 (рис. 4.4, *а*).

Если же в опытной хромосоме возникает летальная мутация l_m, то в F_2 будут только самки, так как самцы обоих классов погибнут — в одном случае из-за наличия летали в *X*-хромосоме *ClB*, в другом — из-за наличия летали l_m в опытной *X*-хромосоме (см. рис. 4.4, *б*). Определяя отношение числа *X*-хромосом (пробирок с индивидуальными скрещиваниями), в которых возникла леталь, к общему числу изученных *X*-хромосом (пробирок), подсчитывают частоту летальных мутаций в определенной группе или выборке.

Рисунок 4.4

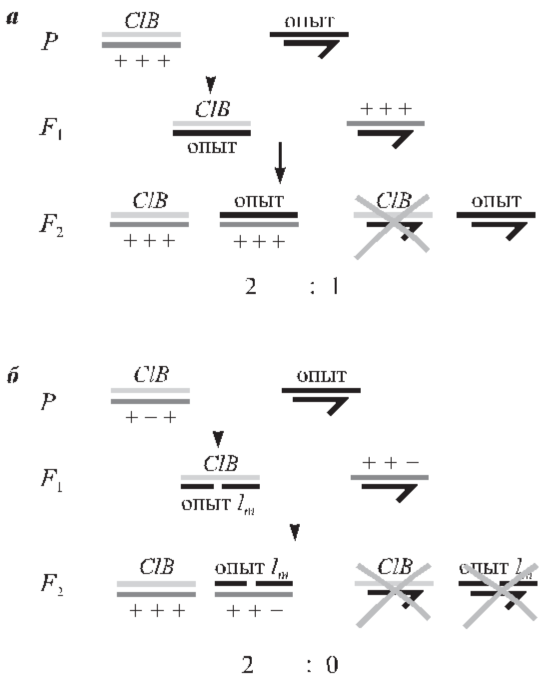


Схема скрещиваний для выявления летальных мутаций в *X*-хромосоме дрозофилы:

а — в отсутствие, *б* — при наличии летальной мутации

Мёллер, а затем и другие исследователи, неоднократно модифицировал и свой метод выявления леталей в *X*-хромосоме дрозофилы, в результате чего появились такие линии-анализаторы, как *Mu-5*, а позднее — линии-балансеры *Basc, Binsn*, *FM7* и т. д.

Метод *Cy L/Pm*. Для учета летальных мутаций в аутосомах дрозофилы используют линии сбалансированных леталей. Например, для обнаружения леталей во второй хромосоме используют линию *Cy L*/*Pm* (рис. 4.5).

В этой линии в одной хромосоме расположены доминантные мутации *Cy* (*Curly* — загнутые крылья) и *L* (*Lobe* — маленькие дольковидные глаза), каждая из которых в гомозиготном состоянии вызывает летальный эффект. Мутации сопряжены с инверсией, подавляющей кроссинговер. В гомологичной хромосоме, также несущей инверсию, присутствует доминантная мутация *Pm (Plum* — коричневые глаза). Анализируемого самца скрещивают с самкой из линии *Cy L/Pm* (на схеме показаны не все классы потомков).

Рисунок 4.5

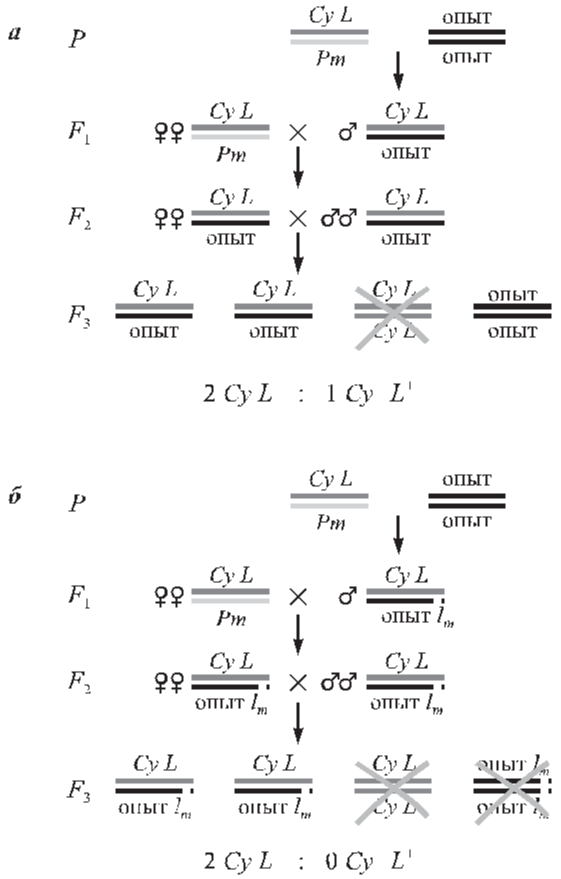


Схема скрещиваний для выявления летальных мутаций во второй хромосоме дрозофилы:

а — в отсутствие, *б* — при наличии летали

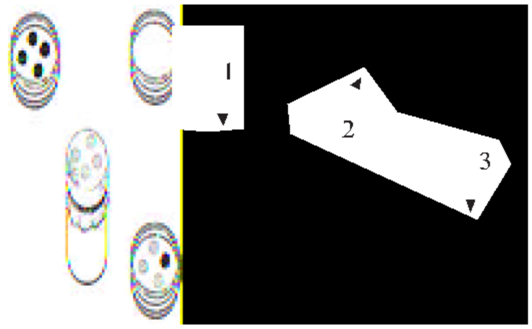
В F_1 отбирают самцов *Cy L/Pm*$^+$ и индивидуально скрещивают их с самками исходной линии *Cy L/Pm*. В F_2 отбирают самцов и самок *Cy L*, у которых гомологичная хромосома является испытуемой. В результате скрещивания их между собой получается 3 класса потомков. Один из них погибает из-за гомозиготности по мутациям *Cy* и *L*, еще один класс потомков — это гетерозиготы *Cy L/Pm*$^+$, а также класс гомозигот по испытуемой хромосоме. В итоге получаются мухи *Cy L* и *Cy*$^+$ *L*$^+$ в соотношении 2 : 1 (см. рис. 4.5, *а*). Если в испытуемой хромосоме произошла летальная мутация, в потомстве от последнего скрещивания будут только мухи *Cy L* (см. рис. 4.5, *б*). С помощью такого метода можно учитывать частоту рецессивных летальных мутаций во второй хромосоме дрозофилы.

Учет мутаций у микроорганизмов. Использование микроорганизов очень удобно из-за того, что все гены у них в единственном числе и мутации проявляются уже в первом поколении. Кроме того, каждая клетка на плотной среде может образовать отдельную колонию, представляющую собой клон идентичных клеток.

Если получают мутации, дающие селективное преимущество, то мутантов легко обнаружить методом отпечатков, или реплик, предложенным Э. и Дж. Ледербергами (рис. 4.6).

Для выявления мутаций устойчивости *E. coli* к бактериофагу T1 клетки бактерий высевают на агаризованную среду в чашки Петри при таком разведении культуры, чтобы образовались отдельные колонии. Затем при помощи бархатной печатки эти колонии перепечатывают на чашки с нанесенной суспензией частиц фага T1. Большая часть клеток исходной чувствительной (*TonS*) культуры не будет образовывать колоний, поскольку их лизирует бактериофаг. Вырастут лишь отдельные мутантные колонии (*TonR*), устойчивые к фагу. Подсчитывая число колоний в контрольном и опытном (например, после облучения ультрафиолетовым светом) вариантах, легко определить частоту индуцированных мутаций.

Рисунок 4.6



Метод отпечатков для обнаружения мутантов у бактерий, устойчивых к фагу T1:

1 — получение отпечатка колоний на бархате, *2* — перепечатка на среду, *3* — инкубация отпечатка. Растущие колонии — черные

4.2.2. Спонтанные мутации

В любой популяции живых организмов всегда есть особи, несущие мутации. Многие годы до открытия искусственной индукции мутаций селекционеры и исследователи наследственности, включая Менделя и Моргана, использовали мутации этого типа. Их называют спонтанными.

Начиная с 1925 г. С. С. Четвериков и его молодые коллеги Б. Л. Астауров, Н. К. Беляев, С. М. Гершензон, П. Ф. Рокицкий, Д. Д. Ромашов в результате экспериментальной проверки природных популяций дрозофилы нашли в них большое число различных мутаций. Каждый ген с той или иной частотой спонтанно переходит в мутантное состояние (табл. 4.2).

Причины индукции спонтанных мутаций не совсем ясны (см. разд. 8.1.5). Долгое время полагали, что к числу индуцирующих факторов относится естественный фон ионизирующих излучений. Однако, как показали расчеты, для дрозофилы естественный радиационный фон может быть ответствен только приблизительно за 0,1 % спонтанных мутаций. Хотя по мере увеличения продолжительности жизни организма воздействие естественного фона может накапливаться, и у человека от 1/4 до 1/10 спонтанных мутаций может быть отнесено за счет естественного фона радиации [Гершензон, 1983].

Второй причиной спонтанных мутаций являются случайные повреждения хромосом и генов в ходе нормальных метаболических процессов, происходящих в клетке. По многочисленным данным, спонтанные мутации возникают во время деления хромосом и репликации ДНК. Считают вероятным, что спонтанные мутации представляют собой чаще всего следствие случайных ошибок в функционировании молекулярных механизмов.

Третьей причиной спонтанных мутаций является перемещение по геному мобильных элементов (см. разд. 6.7), которые могут внедриться в любой ген и вызвать в нем мутацию. По расчетам американского генетика М. Грина, около 80 % мутаций, которые были открыты как спонтанные, возникли в результате перемещений мобильных элементов.

Таблица 4.2. Частота спонтанных мутаций некоторых генов [Гершензон, 1983. С. 222]

Тип, класс	Вид	Мутационное изменение	Направление мутирования	Частота мутаций
Млекопитающие	Человек	Альбинизм	$+ \to a$	$2{,}8–3{,}3 \times 10^{-5}$
		Фенилкетонурия	$+ \to ph$	$2{,}5–8 \times 10^{-5}$
		Микроцефалия	$+ \to mc$	$2{,}7 \times 10^{-5}$
		Гемофилия	$+ \to h$	$2–3{,}2 \times 10^{-5}$
		Анирidия	$+ \to Anir$	$0{,}5 \times 10^{-5}$
	Мышь	Ослабленная окраска	$+ \to d$	3×10^{-5}
		Альбинизм	$+ \to c$	3×10^{-5}
		Пегость	$+ \to s$	3×10^{-5}
Насекомое	Дрозофила	Желтое тело	$+ \to y$	1×10^{-5} (у самок)
		То же	$+ \to y$	1×10^{-4} (у самцов)
		Белые глаза	$+ \to w$	$2–4 \times 10^{-5}$
		Вильчатые щетинки	$+ \to f$	$2{,}9 \times 10^{-5}$
		То же	$f \to +$	$1{,}5 \times 10^{-5}$
		Вырезки на крыльях	$+ \to ct$	$1{,}5 \times 10^{-4}$
		Коричневые глаза	$+ \to bw$	3×10^{-5}
Цветковое растение	Кукуруза	Пурпурный эндосперм	$+ \to pr$	$1{,}1 \times 10^{-5}$
		Сахарный эндосперм	$+ \to su$	$2{,}4 \times 10^{-6}$
		Морщинистый эндосперм	$+ \to sh$	$1{,}2 \times 10^{-6}$
Водоросль	Хламидомонада	Устойчивость к стрептомицину	$+ \to str^r$	1×10^{-6}
Грибы	Нейроспора	Потребность в аденине	$ade^- \to ade^+$	4×10^{-8}
		Потребность в инозитоле	$ino^- \to ino^+$	$2–8 \times 10^{-8}$
	Пекарские дрожжи	Потребность в метионине	$met^- \to met^+$	$3{,}4–6{,}5 \times 10^{-8}$
Бактерии	Кишечная палочка	Потребность в гистидине	$his^+ \to his^-$	2×10^{-8}
		То же	$his^- \to his^+$	2×10^{-6}
		Устойчивость к стрептомицину	$str\text{-}s \to str\text{-}d$	2×10^{-8} 1×10^{-9}
		Потребность в лактозе	$lac^- \to lac^+$	2×10^{-7}
		Устойчивость к фагу T5	$T5s \to T5r$	7×10^{-8}
	Золотистый стафилококк	Устойчивость к сульфамиду	$sul^- \to sul^+$	1×10^{-9}
Вирусы	Фаг T2	Изменение круга хозяев	$h^+ \to h^-$	3×10^{-9}
	Фаг T4	То же	$+ \to rII$	2×10^{-5} 1×10^{-7}
	Вирус мозаичности табака	Мозаичность типа аукуба	$+ \to auc$	$1{,}6 \times 10^{-8}$

Примечание. Частота мутаций указанных в таблице генов приведена на один цикл размножения, для бактерий и дрожжей — на одно клеточное деление, для прочих организмов — на одно поколение.

4.2.3. Индуцированные мутации

История открытия индуцированных мутаций знает много примеров. Тут и неудачная попытка Т. Моргана, и весьма успешная попытка Г. А. Надсона и Г. С. Филиппова в СССР, которые, облучая рентгеновскими лучами культуры плесневых грибов *Mucor genevensis*, в 1925 г. получили расщепление культуры «на две формы или расы». «Таким образом получились две формы, два мутанта, отличающиеся не только друг от друга, но и от исходной (нормальной) формы». Мутанты оказались стабильными, так как «дальнейшие восемь генераций (восемь последовательных пересевов) уже не подвергались действию рентгеновских лучей и тем не менее сохраняли приобретенные свойства: они оказались стойко наследственно закрепленными». Их статья была опубликована только на русском языке, к тому же в работе не использовались какие-либо методы количественной оценки действия рентгеновских лучей, и в целом она осталась малозамеченной.

Рисунок 4.7

Сергей Михайлович Гершензон
(1906–1998)

Рисунок 4.8

Шарлотта Ауэрбах
(1899–1994)

В 1927 г. Г. Мёллер сообщил о действии рентгеновских лучей на мутационный процесс у дрозофилы и предложил ставший классическим количественный метод учета рецессивных летальных мутаций в *X*-хромосоме (см. рис. 4.4).

В 30-х гг. был открыт химический мутагенез у дрозофилы: В. В. Сахаров (1932), М. Е. Лобашев и Ф. А. Смирнов (1934) показали, что некоторые соединения, такие как йод, уксусная кислота, аммиак, способны индуцировать рецессивные летали в *X*-хромосоме.

В 1939 г. С. М. Гершензон (рис. 4.7) открыл сильный мутагенный эффект экзогенной ДНК у дрозофилы. Под влиянием идей Н. К. Кольцова о том, что генная нить в хромосомах является цепью больших органических молекул или, возможно, одиночной гигантской молекулой, С. М. Гершензон решил проверить свое предположение, что именно ДНК является такой молекулой. Он изолировал ДНК из тимуса и добавил ее в корм личинкам дрозофилы. Среди примерно 15 тыс. проанализированных контрольных мух (т. е. без ДНК в корме) не было получено ни одной мутации, в то время как в опытной серии среди примерно 13 тыс. мух были получены 13 видимых мутаций (табл. 4.3).

В 1941 г. Ш. Ауэрбах (рис. 4.8) и Дж. Робсон, используя метод *ClB* Мёллера, показали, что горчичный газ (азотистый иприт) индуцирует мутации у дрозофилы. Из-за вполне понятной во время Второй мировой войны секретности результаты работы с этим отравляющим газом не были опубликованы до 1946 г. В том же 1946 г. И. А. Рапопорт (рис. 4.9) в СССР продемонстрировал мутагенную активность формальдегида. С тех пор в арсенал мутагенных факторов вошли разнообразные химические соединения.

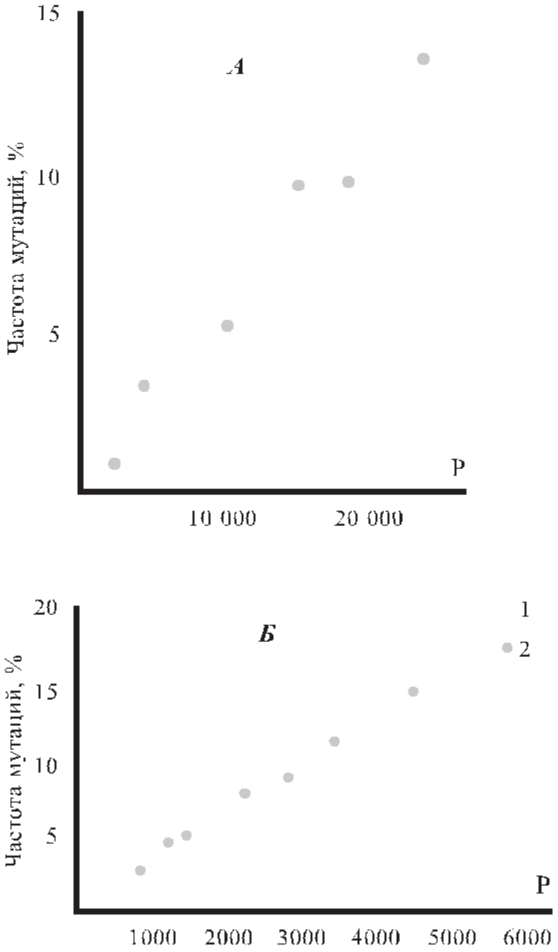
Таблица 4.3. Индукция видимых мутаций в результате скармливания экзогенной ДНК у *D. melanogaster* [Gershenson, Alexandrov, 1997. P. 186]

	Эксперимент			Контроль		
	1939 г.	1940 г.	Всего	1939 г.	1940 г.	Всего
Число скрещиваний	228	422	650	208	413	621
Число мух F_1	12 684	20 761	33 445	14 481	23 401	37 882
Число мутаций	13	25	38	0	0	0

Рисунок 4.9

Иосиф Абрамович Рапопорт
(1912–1990)

Рисунок 4.10



А. Прямолинейная зависимость частоты видимых мутаций у нейроспоры от дозы рентгеновского облучения [По М. Демереку. — Из: Гершензон, 1983. С. 228].

Б. Зависимость частоты возникновения рецессивных сцепленных с полом мутаций у дрозофилы от дозы рентгеновского облучения:
1 — теоретически ожидаемые, *2* — экспериментальные данные [По Н. В. Тимофееву-Ресовскому. — Из: Гершензон, 1983. С. 227]

В последние годы используют аналоги оснований, включающиеся непосредственно в ДНК, это такие соединения, как азотистая кислота или гидроксиламин, соединения, алкилирующие ДНК (этилметансульфонат, метилметансульфонат и др.), соединения, интеркалирующие между основаниями ДНК (акридины и их производные). Все эти вещества стали называть супермутагенами из-за их высокой эффективности в индукции мутаций. Так, в работе И. А. Рапопорта (1946) при действии сублетальной дозы водного раствора формалина на личинок дрозофилы было получено 47 летальных мутаций на 794 *X*-хромосомы, изученные с помощью метода *ClB* (частота 5,9 %), в контроле была найдена лишь одна летальная мутация на 833 хромосомы (частота 0,12 %). В работах Ауэрбах и Робсона частота мутаций достигала 24 % (в контроле — 0,2 %).

В 1958 г. С. И. Алиханяном и Т. С. Ильиной был установлен факт индукции мутаций у актиномицетов под действием актинофагов. После этого появились многочисленные публикации из разных лабораторий, в которых установлено, что в результате вирусной инфекции живых организмов (или клеток в культуре) индуцируются хромосомные или хроматидные перестройки (транслокации, делеции, фрагментации хромосом или их пульверизация), реже анеуплоидия и полиплоидия.

В начале 80-х гг. американские генетики А. Спрадлинг и Дж. Рубин предложили метод мутагенеза, заключающийся в активировании перемещений мобильного *P*-элемента (см. разд. 6.7), в результате чего он может встраиваться в любой ген дрозофилы. Встройка (инсерция) мобильного элемента приводит к мутации данного гена. Таким образом, по морфологическим критериям можно отобрать мутантную линию дрозофил, в которой есть инсерция ДНК известного состава, что позволяет выделить ДНК мутировавшего гена. В результате

исследователи дрозофилы получили возможность выделять и клонировать ДНК любого интересующего их гена. Это открытие сделало революцию в молекулярной биологии.

Изучение мутагенного действия ионизирующих излучений показало, что у всех исследованных организмов они вызывают многочисленные генные мутации и перестройки хромосом и что частота индуцированных мутаций зависит в основном от дозы радиации (рис. 4.10).

В 1962 г. Н. П. Дубинин, Ю. Я. Керкис и Л. И. Лебедева установили, что даже малые дозы облучения вызывают увеличение частоты мутаций. В культуре клеток человека уже 10 рентген удваивают частоту образования хромосомных аберраций (рис. 4.11) по сравнению с уровнем спонтанного мутагенеза. При этом не имеет большого значения, в один ли прием дана та или иная доза или она разбита на порции, разделенные во времени, — мутагенный эффект в целом сооответствует общей дозе облучения. При облучении не существует нижнего порога мутагенного действия.

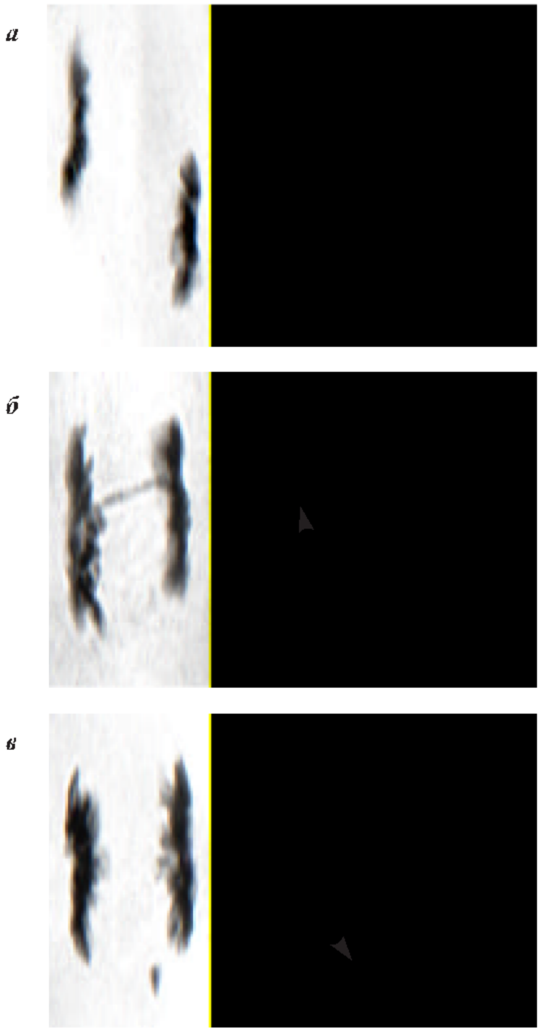
Первые работы по применению рентгеновских лучей в селекции для отбора нужных мутаций были проведены А. А. Сапегиным и Л. Н. Делоне в конце 20-х — начале 30-х гг., т. е. сразу же после открытия возможности искусственной индукции мутаций. Затем такие работы развернулись и в других странах, и в настоящее время эффективность экспериментального мутагенеза общепризнана.

Наиболее заметны успехи в отборе мутантов при селекции бактерий и грибов. Здесь быстрота смены поколений и огромное число особей в каждой культуре очень ускоряют темп селекции (табл. 4.4). В ряде случаев удалось повысить активность продуцентов в 10–20 раз, что позволило значительно увеличить производство соответствующих антибиотиков и резко снизило их стоимость, причем это было достигнуто в очень короткие сроки.

Похожие результаты получены при использовании мутагенов в селекции микроорганизмов, продуцирующих другие биологически активные вещества. Так, активность лучистого гриба — продуцента витамина B_{12} повысилась в 6 раз, а активность бактерии — продуцента аминокислоты лизина — даже в 300–400 раз.

Использование мутаций карликовости у пшеницы обусловило в 60–70-х гг. резкое увеличение урожая зерновых культур, названное «зеленой революцией». Сорта на основе карликовости отличаются укороченным толстым стеблем, устойчивым к полеганию, который выдерживает повышенную нагрузку от более крупного колоса. Эти сорта в сочетании с изменением агротехники позволили очень существенно увеличить урожаи (в некоторых странах в несколько раз).

Рисунок 4.11



Нормальная анафаза (*а*), а также образовавшиеся в результате облучения хромосомный мост (*б*) и ацентрический фрагмент (*в*) (указаны стрелками) в культуре клеток человека [Дубинин и др., 1962]

Дополнение 4.2

Творцом «зеленой революции» считают американского селекционера и генетика Н. Борлауга (р. 1914), с 1944 г. работающего в Мексике. За успехи в создании технологий выведения высокопродуктивных сортов растений в 1970 г. ему была присуждена Нобелевская премия мира.

В 1946 г. за открытие радиационного мутагенеза Г. Мёллеру была присуждена Нобелевская премия.

Таблица 4.4. Результаты селекции с применением мутагенных факторов у микроорганизмов — продуцентов некоторых антибиотиков [Гершензон, 1991. С. 94]

Антибиотик	Мутагены*	Активность (усл. ед.)	
		исходная	полученная
Пенициллин	Р, УФ, АИ, ЭИ	220	5 200
Стрептомицин	АИ, ЭИ	250	4 200
Хлортетрациклин	Р, УФ, ЭИ	600	2 200
Эритромицин	УФ, ЭИ	500	2 000
Альбомицин	Р	2 000	12 000
Олеандомицин	ЭИ	150	1 500

* АИ — азотистый иприт, Р — рентгеновские лучи, УФ — ультрафиолетовые лучи, ЭИ — этиленамин.

Литература к разделам 4.1–4.2

Алиханян С. И., Ильина Т. С. Мутагенное действие актинофагов // Докл. АН СССР. 1958. Т. 120. С. 423–428.

Вавилов Н. И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 9–50.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 211–240.

Гершензон С. М. Мутации. Киев: Наук. думка, 1991. 111 с.

Дубинин Н. П. Избранные труды: В 4 т. М.: Наука. Т. 1: Проблемы гена и эволюции. 2000. С. 396–412. Т. 2: Радиационный и химический мутагенез. 2000. 465 с.

Дубинин Н. П., Керкис Ю. Я., Лебедева Л. И. Эффект малых доз радиации на хромосомные перестройки при облучении клеток в культурах эмбриональных тканей человека // Радиационная генетика. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 39–49.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 290–369.

Кулаева О. Н. Карликовые мутанты и их роль в «зеленой революции» // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 8. С. 18–23.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 285–315, 382–415.

Надсон Г. А., Филиппов Г. С. О влиянии рентгеновских лучей на половой процесс и образование мутантов у низших грибов (Mucoraceae) // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 120–124.

Ратнер В. А. Впереди событий и в стороне от признания: [О С. М. Гершензоне] // Природа. 1998. Т. 8. С. 100–102.

Филипченко Ю. А. Изменчивость и методы ее изучения. М.: Наука, 1978. 238 с.

Шноль С. Э. Герои и злодеи Российской науки. М.: Крон-пресс, 1997. 462 с.

Dickman S. A lifetime of struggle to do good science // Science. 1992. Vol. 258. P. 25.

Gershenson S. M., Alexandrov Yu. N. Molecular mechanisms of mutagenecity of DNA and other natural and synthetic polynucleotides. Kiev: Polymed Printing, 1997. 263 p.

Kilbey B. J. Charlotte Auerbach (1899–1994) // Genetics. 1995. Vol. 141. P. 1–5.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. 75 p.

Muller H. J. Artificial transmutation of the gene // Science. 1927. Vol. 66. P. 84–87.

Muller H. J. The problem of genic modification // Zeitschr. ind. Abst. Vererb. Sup. 1927. Bd 1. S. 234–260.

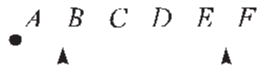
Suzuki D. T., Kaufman T. C., Falk D., U.B.C. *Drosophila* Research Group. Conditionally expressed mutations in *Drosophila melanogaster* // The genetics and biology of *Drosophila* / Ed. M. Ashburner, E. Novitski. London; New York; San Francisko: Academic Press, 1976. Vol. 1a. P. 208–263.

4.3. ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

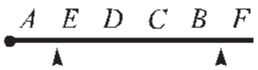
4.3.1. Инверсии

Инверсии — хромосомные перестройки, связанные с поворотом отдельных участков хромосомы на 180°, были открыты А. Стёртевантом в 1926 г.

Инверсии бывают пара- и перицентрическими. В случае парацентрической инверсии происходят два разрыва хромосом, оба по одну сторону от центромеры. Участок между точками разрывов поворачивается на 180°.

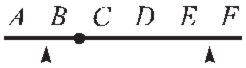


Нормальная хромосома

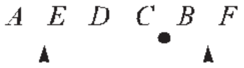


Парацентрическая инверсия

При перицентрической инверсии точки разрывов расположены по обе стороны от центромеры.



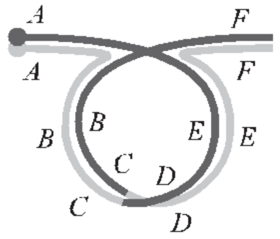
Нормальная хромосома



Перицентрическая инверсия

Для инверсий приняты специальные обозначения: например, *In(1)BE* означает, что инверсия (*In*) произошла в первой хромосоме (*1*), *BE* — инвертированный район.

У особей, гетерозиготных по инверсии, в хромосомах образуется петля (рис. 4.12).



У гомозигот по инверсиям кроссинговер происходит нормально. У гетерозигот по парацентрической инверсии происходит «запирание» кроссинговера следующим образом: в случае перекреста между генами *C* и *D* образуются два продукта: ацентрические и дицентрические хромосомы, т. е. без центромеры и с двумя центромерами соответственно.

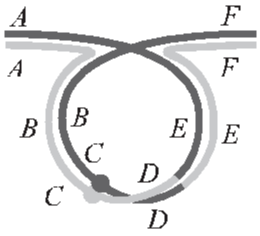
Дицентрик

Ацентрик

Обе комбинации летальны. Таким образом, в результате кроссинговера образуются нежизнеспособные гаметы, и он не регистрируется в потомстве.

Двойной кроссинговер, происшедший в пределах инверсии, восстанавливает образование гамет.

В случае перекреста между генами *D* и *E* в перицентрической инверсии получаются два продукта.



Дупликация *A* и делеция *F*

Дупликация *F* и делеция *A*

Каждая из полученных хромосом несет дупликацию одного неинвертированного района хромосом и делецию другого. В результате такие гаметы нежизнеспособны и кроссоверы не выявляются. Так же как и парацентрические, перицентрические инверсии «запирают» кроссинговер.

Поскольку кроссинговер в инвертированном участке хромосомы «заперт», в нем могут формироваться блоки мутаций, отличные от тех, которые локализованы в гомологичном фрагменте хромосомы, но не инвертированном.

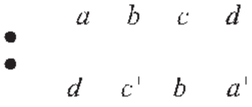
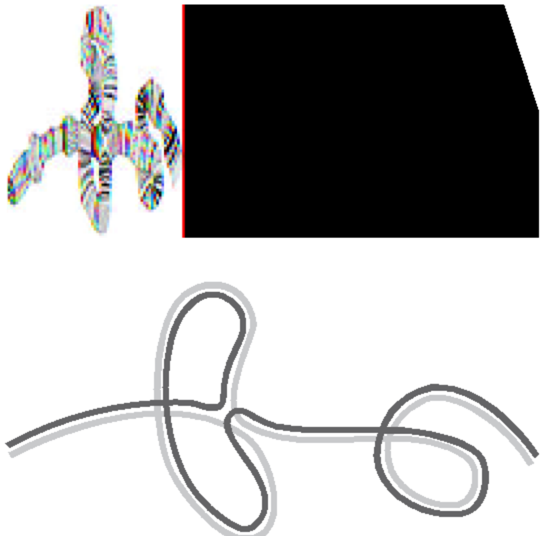


Рисунок 4.12



Гетерозиготная инверсия в политенных хромосомах дрозофилы (рисунок из работы Т. Пайнтера 1934 г.) и схема расположения гомологов

Инверсионный полиморфизм в популяциях способствует накоплению определенных мутаций в инвертированных участках хромосом, поэтому исследованию инверсий в популяциях уделяется большое внимание. В 1936 г. Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов и Г. Г. Тиняков опубликовали результаты анализа хромосомной изменчивости в 20 популяциях *D. melanogaster* из разных районов Советского Союза. Среди 34,5 тыс. изученных хромосом свыше 5 % содержали инверсии. В то же время межхромосомные перестройки не встретились ни разу. Число различных инверсий было ограничено, и каждая из них занимала свой участок видового ареала. Аналогичные выводы одновременно были получены А. Стёртевантом и Ф. Г. Добржанским в популяциях *D. pseudoobscura*. Работы по инверсионному полиморфизму проводятся на очень многих видах.

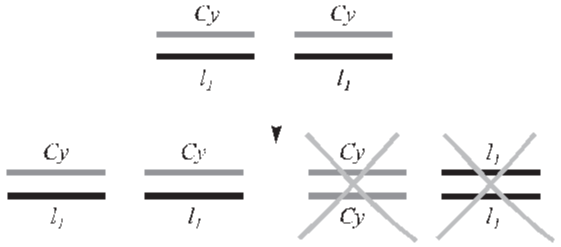
Хромосомы с множественными инверсиями используют при создании балансеров, т. е. линий, позволяющих поддерживать летальные мутации и мутации по плодовитости. Один из примеров — уже упоминавшаяся линия *ClB*. Более надежными балансерами, т. е. содержащими несколько инверсий, являются линии *Basc*, *Binsn*. Конструирование балансерных хромосом по существу представляет собой первый пример генетической инженерии.

Другой пример балансеров — линия *Cy* (загнутые крылья, летальность), в которой доминантная мутация сопряжена с длинной инверсией, захватывающей почти всю вторую хромосому (рис. 4.13). В потомстве от скрещивания гетерозигот по *Cy* выживают только мухи родительских классов, т. е. линия сбалансирована, и исследуемая леталь l_1 постоянно в ней поддерживается в гетерозиготном состоянии.

Обнаружение инверсий возможно генетическими методами. В результате скрещивания гетерозигот по четырем генам, расположенным в *X*-хромосоме дрозофилы

$$y\ ct\ v\ f / + + + + \times + + + + / Y,$$

Рисунок 4.13



Балансировка летали l_1 с помощью балансера *Cy*

в потомстве теоретически может получиться 16 классов самцов. Однако в опыте получилось, что ряд классов отсутствует (взяты в скобки):

Некроссоверы

y ct v f + + + +

Кроссоверы

(*y* + + +) + + *v f*
(+ *ct v f*) *y ct v* +
y ct + + + + + *f*

Двойные кроссоверы

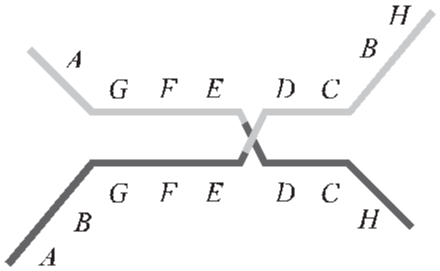
(*y* + *v f*) + + *v* +
(+ *ct* + +) (*y* + + *f*)
y ct + *f* (+ *ct v* +)

Тройные кроссоверы

(+ *ct* + *f*) (*y* + *v* +)

Совершенно очевидно, что отсутствуют кроссоверы, возникающие при обмене на участке между *y* и *ct*. Это свидетельствует о наличии инверсии в этом районе.

С. М. Гершензон в 1940 г. предложил способ получения делеций и дупликаций в результате кроссинговера между двумя инверсиями, имеющими близко расположенные точки разрыва:



У гетерозигот по двум инверсиям кроссинговер приводит к образованию двух хромосом:

A G F E D C H
A B G F E D C B H

В первой из них образовалась делеция района *B*, во второй — дупликация этого же района.

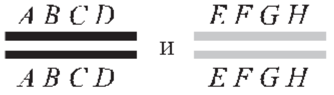
4.3.2. Транслокации

Хромосомные перестройки, в результате которых часть хромосомы переносится в другое место той же хромосомы или в другую хромосому, но общее число генов не изменяется, называются транслокациями. Транслокации были открыты К. Бриджесом в 1923 г. у дрозофилы.

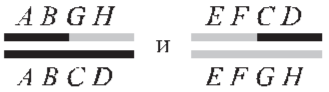
Внутрихромосомные транслокации возникают в результате образования трех разрывов

и перенесения хромосомного сегмента в другой район той же хромосомы. Межхромосомные реципрокные транслокации возникают в результате образования двух разрывов и обмена участками негомологичных хромосом.

Две хромосомы



в результате реципрокного обмена фрагментами образуют гетерозиготную транслокацию



Реципрокные транслокации у дрозофилы обозначают следующим образом: например, *T(2;3)35A;71C* означает, что транслокация (*T*) произошла между второй и третьей хромосомами, 35A и 71C — точки разрывов на цитологических картах этих хромосом.

Если образуются три разрыва и фрагмент хромосомы удаляется из одной хромосомы и встраивается в другую — это инсерционная транслокация. В результате расщепления в последующих поколениях возникает делеция в одной хромосоме и дупликация в другой.

Инсерционные транслокации у дрозофилы обозначают таким образом: например, *T(2;3) 22A–23A; 64E*, т. е. транслокация участка 22A–23A второй хромосомы в участок 64E третьей.

Реципрокные транслокации выявляют в генетических экспериментах, если в результате скрещивания изменяется расщепление. Если скрестить самок, гомозиготных по мутациям *dp* (2-я хромосома) и *e* (3-я хромосома), с самцами, гетерозиготными по этим генам, в потомстве появляется 4 класса в соотношении 1 : 1 : 1 : 1:

$$\frac{dp\ \ e}{dp\ \ e} \quad \frac{dp\ \ e}{dp^+\ e^-}$$

▼

$$\frac{dp\ \ e}{dp\ \ e} \quad \frac{dp\ \ e}{dp^+\ e^+} \quad \frac{dp\ \ e}{dp^+\ e} \quad \frac{dp\ \ e}{dp\ \ e^+}$$

1 : 1 : 1 : 1

Если же у самца участок хромосомы с геном *e* перенесен в хромосому с геном *dp*, расщепление изменяется, поскольку *dp* и *e* попадают в одну гамету, а dp^+ и e^+ — в другую. В результате нарушается независимое расхождение *dp* и *e* в мейозе и у самцов образуется не четыре сорта гамет, как в первом случае, а только два:

$$\frac{dp\ \ e}{dp\ \ e} \quad \frac{dp\ \ e}{dp\ \ e^+}$$

▼

dp e ◄ *dp e* $dp^+\ e^+$

$$\frac{dp\ \ e}{dp\ \ e} \quad \frac{dp\ \ e}{dp^+\ e}$$

1 : 1

На цитологических препаратах у гетерозигот по реципрокным транслокациям в профазе мейоза можно наблюдать характерную структуру — крест. Ее появление связано с тем, что гомологичные участки хромосом, оказавшиеся в разных хромосомах, притягиваются.

Транслокации широко используют для генетического анализа. У дрозофилы с помощью серии транслокаций между *X*- и *Y*-хромосомами или аутосомами и *Y*-хромосомой получают сегментальные анеуплоиды (см. разд. 4.4.5). Транслокации между *X*- и *Y*-хромосомами и аутосомами у млекопитающих использовали для поиска центра инактивации при дозовой компенсации *X*-хромосомы (см. разд. 14.7.2) или фактора *TDF*, расположенного в *Y*-хромосоме и определяющего пол у млекопитающих (см. разд. 14.5).

В результате транслокации, называемой «филадельфийской хромосомой», у человека возникает лейкемия (см. разд. 17.3).

У животных гетерозиготы по реципрокным транслокациям встречаются сравнительно редко, тогда как в некоторых природных популяциях многих растений иногда встречаются транслокации, затрагивающие даже более двух негомологичных хромосом. Наиболее ярким примером может служить растение ослинник (энотера), гетерозиготное по транслокациям, вовлекающим 12 из 14 хромосом.

Разрывы и объединения плеч негомологичных хромосом, в результате чего возникают новые хромосомы, состоящие из двух исходных (робертсоновские транслокации), описаны в разделах 9.4.4 и 9.5.5.

4.3.3. Делеции

Делецией называют утрату какого-то участка хромосомы. Делеции были открыты в 1917 г. К. Бриджесом генетическими методами. Уви-

дели делеции цитологически и предложили сам термин Т. Пайнтер и Г. Мёллер в 1929 г. Рассмотрим пример. В нормальной хромосоме гены расположены в определенном порядке:

•*A B C D E F*

При потере фрагмента хромосомы возможны два принципиальных варианта:

•*A B E F*

или

•*A B C* ,

т. е. может быть потеряна средняя или концевая часть хромосомы.

Гетерозиготные делеции цитологически выявляются из-за наличия петли в нормальном гомологе:

•*A B D E F*
•*A B   D E F*
C

Это особенно легко заметить на примере политенных хромосом (рис. 4.14), гомологи которых плотно конъюгируют, и эта петля хорошо заметна.

Для делеций, полученных в хромосомах дрозофилы, также существуют определенные обозначения, например, *Df*(*1*)*C–D* (для первого случая) или *Df*(*1*)*D–F* (для второго). Эта запись означает, что делеция (*Df*) произошла в первой (*1*) хромосоме, а буквы или цифры после скобок — удаляемый сегмент, или фамилия автора, или что-то еще.

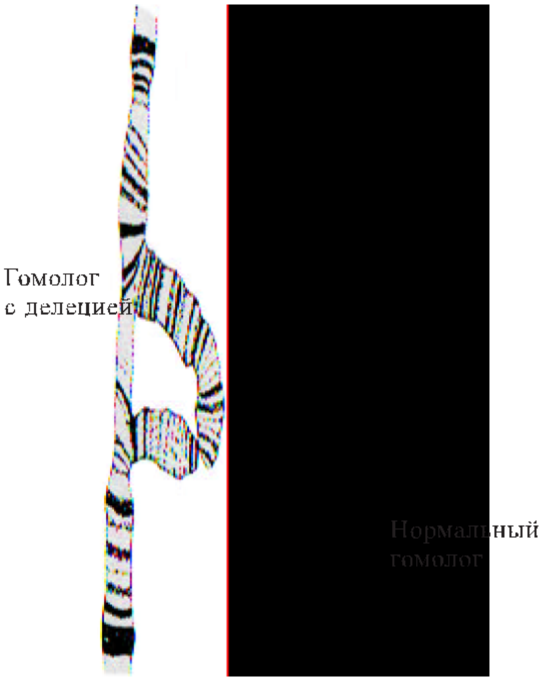
Делеции очень удобны для картирования генов в определенных участках хромосом. Этот метод был предложен в 1935 г., а уже в 1938 г. Х. Слизинска, используя серию перекрывающихся делеций, прокартировала ген *white* в *X*-хромосоме дрозофилы с точностью до одного диска политенной хромосомы.

Рассмотрим пример картирования гена в хромосоме дрозофилы. Используют следующую типовую схему скрещиваний: самок, гетерозиготных по делеции (*Df*) и по балансерной хромосоме *Mu-5*, скрещивают с самцами, несущими хромосому с рецессивными аллелями (*a–f*) картируемых генов. Уже в первом поколении в фенотипе проявляются рецессивные мутации (*d–f*), если они локализованы в участке хромосомы, удаленном делецией (рис. 4.15).

Как правило, делеции затрагивают довольно протяженные участки хромосом, и, если даже ген локализован в ее пределах, точность этого метода невелика. Для более точного цитологического картирования гена в определенном участке хромосомы используют серию перекрывающихся делеций (рис. 4.16).

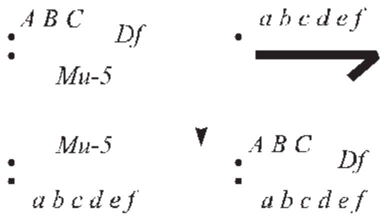
Если ген *l*, расположенный в хромосоме без делеции (+), попадает в пределы делеции 1, но не попадает в пределы делеций 2 и 3, то он

Рисунок 4.14



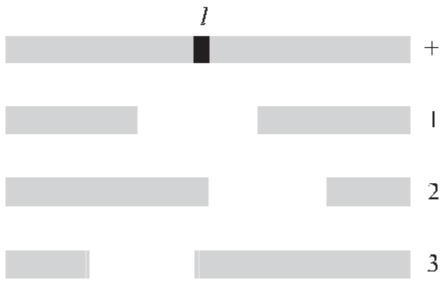
Вид гетерозиготной делеции в политенных хромосомах дрозофилы [Painter, 1934]

Рисунок 4.15



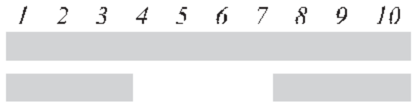
Генетическое картирование с помощью делеции

Рисунок 4.16



Картирование летальной мутации с помощью делеций (обозначены белыми участками)

Рисунок 4.17



Генетическое картирование делеций

может быть картирован только между левой точкой разрыва делеции 2 и правой — делеции 3.

Делеции можно картировать и генетически, с помощью кроссинговера. Для этого получают гетерозиготы по серии мутаций в одной хромосоме и делеции в другой (рис. 4.17). Если гены *1*, *2*, *3*, *8*, *9* и *10* могут вступать в кроссинговер с хромосомой, несущей делецию, а гены *4*, *5*, *6* и *7* — не могут, это означает, что последние находятся в пределах делеции. Точки разрыва делеции при этом располагаются так: левая — между генами *3* и *4*, правая — между генами *7* и *8*.

Аналогичным образом с помощью кроссинговера можно взаимно прокартировать серию перекрывающихся делеций и генов и выяснить порядок расположения тех и других.

Делеции не могут быть очень длинными, поскольку чем они длиннее, тем больше вероятность того, что в районе хромосомы, гомологичном удаленному делецией, находится ген, необходимый для выживания в двух дозах. У человека синдром «кошачьего крика» возникает у гетерозигот по делеции в коротком плече пятой хромосомы. У младенцев-гетерозигот очень высокий мяукающий плач, кроме этого микроцефалия (малый размер головы), значительные нарушения физического и умственного развития. Коэффициент интеллектуальности (I.Q., см. разд. 22.3) у детей с этим синдромом колеблется от 20 до 40.

Особи с очень маленькими делециями в гомозиготе могут оказаться жизнеспособными. Такие делеции обнаружены у кукурузы, дрозофилы и других организмов. У *E. coli* нелетальные делеции составляют около 1% генома. У дрозофилы самая большая из известных делеций, не препятствующих в гомозиготном состоянии жизнеспособности, имеет длину до 4 дисков политенных хромосом. Гетерозиготная самка $Df(1)N^{64i16}/Df(1)dm^{75e19}$ вполне жизнеспособна, хотя у нее отсутствуют диски политенных хромосом от 3C12 до 3D4.

С другой стороны, известны огромные делеции, фактически не влияющие на жизнеспособность в гетерозиготном состоянии. Так, у дрозофилы в ряде случаев утеряна преобладающая часть *X*-хромосомы — остаются только центромеры, прицентромерный гетерохроматин и теломеры. Хромосомы с такими делециями называют свободными дупликациями или мини-хромосомами. Они нормально ведут себя во время клеточных делений, однако могут существовать только при наличии нормальной гомологичной им хромосомы.

4.3.4. Дупликации

Дупликацией называют дополнительный наследственный материал, идентичный тому, который уже есть в геноме. Дупликации открыты К. Бриджесом в 1919 г. Рассмотрим расположение генов в дупликациях разных типов.

Нормальная хромосома:

A B C D E F

Дупликация участка *ABC* — транспозиция в одной и той же хромосоме:

A B C D E F A B C

Тандемная дупликация участка *ABC*:

A B C A B C D E F

Дупликация (инсерционная транслокация, транспозиция) участка *ABC* в результате встраивания его в другую хромосому:

A B C D E F *A B C G H I*

Дупликации обозначают, например, так:

Dp(*1;1*)*ABC* или *Tp*(*1;1*)*ABC*,

т. е. дупликация (*Dp*) материала (*ABC*) первой хромосомы в первой же хромосоме (*1;1*) или, что то же самое, дупликация участка *ABC* за счет транспозиции в эту же хромосому.

Дупликация материала *ABC* первой хромосомы во второй хромосоме (транспозиция участка *ABC* первой хромосомы во вторую) обозначается как *Dp*(*1;2*)*ABC* или *Tp*(*1;2*)*ABC*.

На цитологическом уровне у гетерозигот по дупликации в несущем ее гомологе образуется петля.

A B C D E F

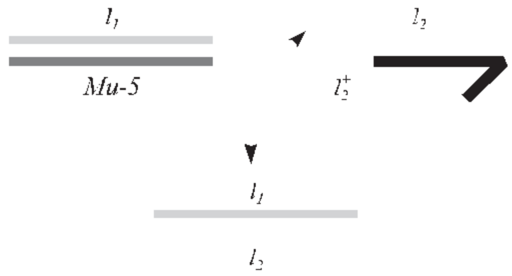
A B C D E F

A C

B

Дупликации широко используются для «перекрытия» мутантного действия леталей или делеций. Так, возникновение летали или делеции в *X*-хромосоме дрозофилы будет приводить к гибели самцов, несущих эту хромосому в гемизиготном состоянии. Однако наличие материала *X*-хромосомы, содержащего нормальный аллель летали и включенного в любую из хромосом (аутосому, *X*- или *Y*-хромосому),

Рисунок 4.18



Использование дупликации l_2^+ для «перекрытия» гемизиготной летали l_2

делает самца жизнеспособным. Он становится носителем летали в единственной *X*-хромосоме и нормального аллеля в дупликации, и его можно скрещивать с самками. Например, если нужно узнать, аллельны ли две летали, следует получить гетерозиготу по ним. Одна *X*-хромосома у потомков может быть получена от самки, вторая — от самца с дупликацией (рис. 4.18).

Дупликации могут приводить к фенотипическому проявлению. Наиболее известным примером служит мутация *Bar* в *X*-хромосоме у дрозофилы. Эта мутация проявляет неполное доминирование, уменьшая число глазных фасеток (см. разд. 3.3.2.6). У самок, гетерозиготных по *Bar,* глаза маленькие и полосковидной формы. У гомо- и гемизигот глаза еще меньше. Мутация *Bar* возникает в результате дупликации маленького участка *X*-хромосомы. Если этот участок утроен, то соответствующее нарушение называется *Double Bar* или *Ultra Bar*.

Литература к разделу 4.3

Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика: В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 32–69.

Гершензон С. М. Мутации. Киев: Наук. думка, 1991. 111 с.

Дубинин Н. П. Избранные труды: В 4 т. Т. 1. Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 363–412.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 290–346.

Кайданов Л. З. Генетика популяций. М.: Высш. шк., 1996. С. 139–164.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 316–348.

Смирнов В. Г. Цитогенетика. М.: Высш. шк., 1991. С. 42–107, 146–194.

Anderson W. W., Arnold J., Baldwin D. J. et al. Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 10367–10371.

Painter T. S. Salivary chromosomes and the attack on the gene // J. Hered. 1934. Vol. 25. P. 465–476.

Roberts P. A. The genetics of chromosome aberration // The genetics and biology of *Drosophila* / Ed. M. Ashburner. London; New York; San Francisco: Academic Press, 1976. Vol. 1a. P. 67–184.

4.4. ПОЛИПЛОИДИЯ

Изменение числа хромосом, когда в клетке присутствует более двух гаплоидных наборов, называют полиплоидией. Этот термин был введен Е. Страсбургером в 1910 г.

В свою очередь гаплоидным (*n*) называют такой набор хромосом, в котором из каждой пары гомологичных хромосом представлена только одна. Он несет в себе часть наследственной информации родителей. Гаплоидный набор хромосом с локализованными в нем генами Г. Винклер (G. Winkler) в 1920 г. предложил называть геномом.

Возможны следующие причины полиплоидии:

1. Неравное расхождение хромосом к полюсам в анафазе.

2. Деление ядра без деления клетки.

3. Удвоение хромосом без их отделения друг от друга.

Организмы, у которых произошло умножение целых гаплоидных наборов, называют собственно полиплоидами или эуплоидами. Полиплоиды, у которых число хромосом не является кратным гаплоидному, называют гетероплоидами или анеуплоидами. Если организм имел $n = 4$ хромосомы, $2n = 8$, то тетраплоид имеет $4n = 16$ хромосом.

Если удвоение геномов происходит в первом делении зиготы, такая полиплоидия называется мейотической, все клетки зародыша будут полиплоидными. Полиплоидизация может также возникать в части клеток в результате нарушения митоза — это соматическая полиплоидия.

Г. Винклер в 1916 г. впервые описал полиплоиды томатов и паслена. К настоящему времени установлено, что около 30 % всех покрытосеменных растений являются полиплоидами. Широко распространена полиплоидия среди растений, возделываемых человеком. У голосеменных растений она редка, хотя встречается у папоротников и мхов. Возможно, полиплоиды лучше приспособлены к произрастанию в суровых условиях: среди всех видов цветковых растений в арктических широтах полиплоиды составляют более 70 %, на Памире — 86 %,

Таблица 4.5. Полиплоидные ряды у покрытосеменных растений [Гершензон, 1991. С. 86]

Род	Основное число хромосом	Число хромосом у видов данного рода
Пшеница	7	14, 28, 42
Пырей	7	14, 28, 42, 56, 70
Овес	7	14, 28, 42
Роза	7	14, 21, 28, 35, 42, 56, 70
Земляника	7	14, 28, 42, 56, 70, 84, 98
Люцерна	8	16, 32, 48
Сахарный тростник	8	48, 56, 64, 72, 80, 96, 112, 120
Свекла	9	18, 36, 54, 72
Хризантема	9	18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90
Щавель	10	20, 40, 60, 80, 100, 120, 200
Хлопчатник	13	26, 52

на Алтае — 65 %. У животных встречается главным образом соматическая полиплоидия.

Группа видов, которые относятся к одному роду и кариотипы которых составляют ряд возрастающего кратного увеличения числа хромосом, называется полиплоидным рядом, например род *Triticum*:

T. monococcum (однозернянка) $2n = 14$
T. durum (твердая) $2n = 28$
T. aestivum (мягкая) $2n = 42$

Таким образом, основное число хромосом, или наименьшее гаплоидное число в полиплоидном ряду (x), у пшениц составляет 7, а *T. monococcum* называют диплоидом, *T. durum* — тетраплоидом и *T. aestivum* — гексаплоидом.

Полиплоидные ряды известны и у других растений (табл. 4.5).

4.4.1. Автополиплоидия

Полиплоиды, возникающие на основе увеличения числа наборов хромосом внутри рода, называют автополиплоидами.

Особенности мейоза автополиплоидов. В норме, у диплоидов, в профазе мейоза образуются биваленты. У тетраплоидов в мейозе образуются квадриваленты — группы из четырех конъюгирующих хромосом, и не всегда четырем гомологичным хромосомам удается найти друг друга и образовать квадривалент. Иногда они образуют группу из трех хромосом (тривалент) и унивалент или два бивалента. Наличие квадривалентов, тривалентов и унивалентов в мейозе у тетраплоидов ведет к нарушениям в распределении хромосом и к образованию гамет с измененным числом хромосом. Кроме правильного расхождения хромосом в мейозе у автотетраплоида (*AAaa*) возможно также расхождение хромосом в соотношении 3 : 1 и 4 : 0. При этом возникнут гаметы *AAa* и *a*, *Aaa* и *A*, а также *AAaa* и 0. Часть таких гамет нежизнеспособна. У диплоида *Aa* ($2n$) образуются гаметы *A* и *a* в соотношении 1:1. У тетраплоида *AAaa* ($4n$) расхождение гомологичных хромосом в мейозе возможно в соотношениях 2 : 2, 3 : 1, 1 : 3, 4 : 0, 0 : 4.

Даже если расхождение хромосом к полюсам будет регулярным (2 : 2), автотетраплоид, гетерозиготный по аллелям *AAaa*, образует три типа гамет в соотношении 1*AA* : 4*Aa* : 1*aa*, и расщепление в моногибридном скрещивании будет сильно отличаться от такового у диплоида:

Гаметы	1 *AA*	4 *Aa*	1 *aa*
1 *AA*	1 *AAAA*	4 *AAAa*	1 *AAaa*
4 *Aa*	4 *AAAa*	16 *AAaa*	4 *Aaaa*
1 *aa*	1 *AAaa*	4 *Aaaa*	1 *aaaa*

Расщепление по фенотипу в F_2 вместо 3 : 1 будет 35 : 1, т. е. при моногибридном скрещивании вероятность появления гомозиготных рецессивных форм во много раз ниже, чем у диплоидов. Поэтому селекционеру отбор по признакам рациональнее вести на низком уровне плоидности.

Тетраплоиды чаще всего имеют большую вегетативную массу (листья, стебли, семена, плоды) (рис. 4.19), размеры клеток увеличены. Однако у них может резко уменьшиться плодовитость (до 5 % от нормы) из-за нарушения расхождения поливалентов в мейозе.

Рисунок 4.19

а *б* *в*

Диплоидный (*а*), триплоидный (*б*) и тетраплоидный (*в*) арбузы [Гершензон, 1991. С. 101]

В результате скрещивания тетраплоида с диплоидом получается триплоид. Эти растения крупнее и мощнее, чем растения с четным числом хромосомных наборов (например, триплоидная форма сахарной свеклы), но полностью стерильные. В лаборатории полиплоидии ИЦиГ СО АН СССР под руководством А. Н. Луткова к середине 60-х гг. было создано несколько сортов триплоидной сахарной свеклы. Один из них, «Кубанский полигибрид 9», был районирован в 1964 г. в Краснодарском крае. Сорт превысил стандартные диплоидные сорта по содержанию сахара на 8,8–10,6 ц/га (15 % прибавки урожая). Ареал занимает до 250 тыс. га, что составляет около 80 % посевных площадей.

«Первомайский полигибрид 10» получен от скрещивания «Ялтушковской односемянной» (4*n*) с «Первомайской» (2*n*). В 1969 г. он занимал 200–250 тыс. га. Превышение по содержанию сахара у этого сорта составляет 2–12 ц/га. У растений большая устойчивость к болезням и вредителям, односемянность.

«Киргизский полигибрид 18» распространен в Киргизии, где занимает 40–50 тыс. га. Превышение над стандартом по содержанию сахара — 6,6 ц/га [Генетика…, 1983].

Недостаток этих гибридов заключается в том, что в результате скрещивания тетра- и диплоидов в потомстве получается только около 55 % триплоидов. Тем не менее экономический эффект от их внедрения в производство к началу 70-х гг. перекрыл расходы, связанные со строительством новосибирского Академгородка.

4.4.2. Аллополиплоидия (амфиполиплоидия)

Аллополиплоидией называют удвоение или многократное умножение хромосомных наборов различной структуры.

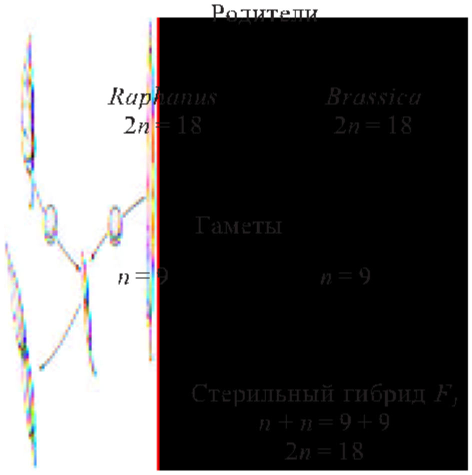
В 1917 г. О. Винге (O. Winge) предположил, что полиплоидные ряды могут возникать в природе в результате межвидовой гибридизации и суммирования числа хромосом скрещивающихся видов, т. е. у аллополиплоида объединяются геномы по крайней мере двух видов.

Мейоз у аллополиплоидов имеет ряд особенностей. Например, объединены геномы S (рожь) и T (пшеница). У гибрида будет два генома — T и S, по 7 хромосом в каждом. В мейозе образуются 14 унивалентов, поскольку хромосомы одного вида не имеют гомологии с хромосомами другого. В анафазе они будут беспорядочно расходиться к полюсам. Гаметы могут иметь от 0 до 14 хромосом (7T + 7S). Гаметы, содержащие оба набора (14 хромосом), называются нередуцированными. При объединении таких гамет образуется зигота с удвоенным набором хромосом каждого вида — аллотетраплоид. Он оказывается фертильным.

В 1925 г. два американских генетика Т. Гудспид (T. Goodspeed) и Дж. Клаусен (J. Clausen) получили вид табака с 72 хромосомами в результате гибридизации 48- и 24-хромосомных видов. Фертильные аллополиплоиды в результате межродовых скрещиваний получил Г. Д. Карпеченко в 1927 г. на растениях. Аллополиплоид у животных от межвидового скрещивания шелкопрядов *Bombix mori* и *B. mandarina* впервые в 1961 г. получили Б. Л. Астауров и В. Н. Верейская.

Г. Д. Карпеченко использовал в скрещиваниях два вида из разных родов — *Brassica oleacea* (капуста) и *Raphanus sativus* (редька). У обоих видов диплоидное число хромосом 2*n* = 18 (рис. 4.20). Гибрид имел 18 хромосом, был мощным, сильно цвел, но семян не образовывал. Отдельные гаметы были нередуцированными, т. е. имели по 9R и 9B хромосом. От них получились устойчивые фертильные аллополиплоидные (или амфидиплоидные) растения с 4*n* = 36, которым автор дал новое видовое название — Рафанобрассика.

Рисунок 4.20



Образование растения *Raphanobrassica* в результате скрещивания редьки и капусты. Следует обратить внимание на форму плода у родителей и гибрида [Karpechenko, 1928]

Аллополиплоидия широко распространена в природе. Известны многие полиплоидные виды и у возделываемых растений. Детально изучены пути формирования аллополиплоидов среди пшениц. Естественный аллополиплоид ($2n = 42$) *Triticum aestivum* (пшеница мягкая, или хлебная) является одним из основных хлебных растений мира. Она имеет геном AABBDD. Для 35 % населения Земли это основной продукт питания. Естественный аллотетраплоид *T. durum* (пшеница твердая, или макаронная) имеет $2n = 28$. Единственный возделываемый диплоидный вид *T. monococcum* (пшеница однозернянка) имеет 14 хромосом.

В 1913 г. А. Шульц (A. Schulz) разделил виды, входящие в род *Triticum*, на три группы: однозернянки, полбы и спельты. Т. Сакамура (T. Sakamura, 1918), Н. Сакс (N. Sax, 1922) и А. Г. Николаева (1922–1923) обнаружили, что однозернянки имеют в соматических клетках 14 хромосом, пшеницы группы полбы — 28, спельты — 42 хромосомы. В 1928 г. К. А. Фляксбергер ввел в систематику пшениц предложенное А. Шульцем и подкрепленное цитологическими исследованиями деление рода *Triticum* на ряды в виде трех групп: ди-, тетра- и гексаплоиды. Было найдено, что основным числом хромосом в роде является $x = 7$. Долгое время западные исследователи донором генома A считали культурную однозернянку — *T. monococcum*. Хотя уже в 1914 г. Д. Ларионов, анализируя результаты ее скрещиваний с *T. dicoccum*, выполненных М. Бейеринк (M. Beyerink), высказался отрицательно относительно этой гипотезы. В случае гомологии хромосом *T. monococcum* ($2n = 14$) семи хромосомам *T. dicoccum* ($2n = 28$) в мейозе у гибрида исследователи должны были бы наблюдать 7 бивалентов и 7 унивалентов. Однако число бивалентов никогда не превышало 4–5, поэтому на основании таких экспериментов можно было делать вывод только о частичной гомологии геномов. В 1970 г. Г. Мэнди (G. Mandy) предложил на роль донора генома A полиплоидных пшениц обнаруженную на территории Армении дикую однозернянку *T. urartu* (пшеница урарту). Позже пшеницы были разделены на два подрода, виды которых различались по геному A: A^u (донор генома *T. urartu*) и A^b (донор генома *T. boeoticum* — беотийская дикая форма пшеницы — предок культурной однозернянки *T. monococcum*) и частично по второму геному. Второй геном у одних был обозначен B, у других — G. Их наиболее вероятными донорами послужили разные расы эгилопса *Aegilops speltoides* или какие-то несохранившиеся в настоящее время родственные им виды эгилопсов. Таким образом, пшеницы-однозернянки имеют геномы A^u и A^b, тетраплоидные пшеницы подрода *Triticum* — A^uA^uBB, подрода *Boeoticum* — A^bA^bGG.

Из каких компонентов состоят геномы 42-хромосомных пшениц?

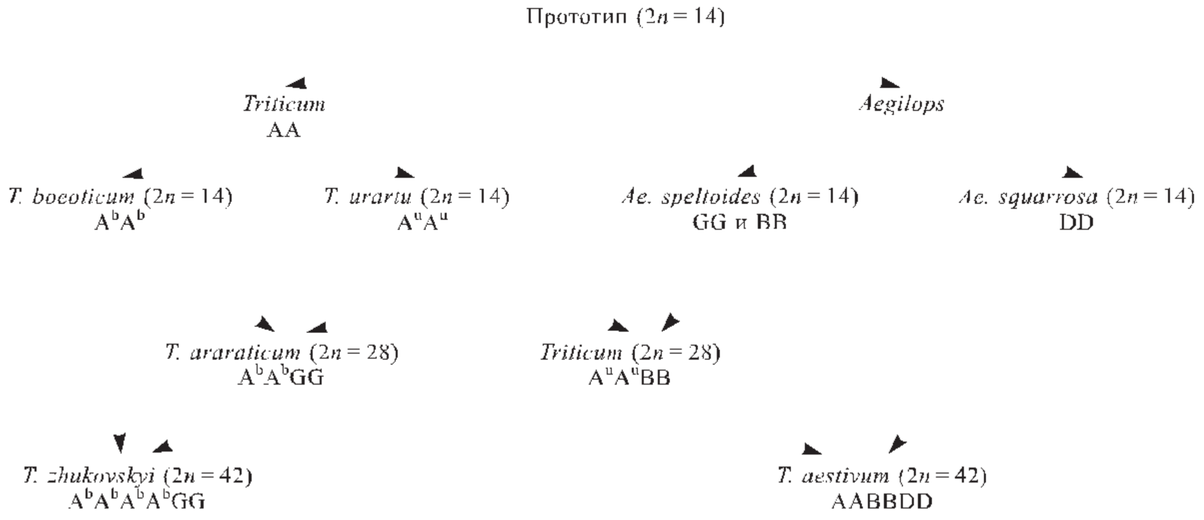
Единственный гексаплоидный вид подрода *Boeoticum* — *T. zhukovskyi* (пшеница Жуковского) имеет геном $A^bA^bA^bA^b$GG, т. е. он произошел в результате удвоения одного из геномов первичного тетраплоида.

Исследования в подроде *Triticum* показали в мейозе у гибридов от скрещивания *T. spelta* с тетраплоидными (A^uA^uBB) видами формирование 14 бивалентов и 7 унивалентов. Таким образом было установлено, что гексаплоидные виды имеют по два общих генома (A^u и B) с тетраплоидными видами и еще один, отличный от них геном D (от нем. Dinkel — спельта). Значит, и спельта, и мягкая пшеница имеют геномную формулу A^uA^uBBDD. Путем ресинтеза искусственного аллогексаплоида Е. МакФадден (E. McFadden) и Е. Сирс (E. Sears) показали, что донором генома D является вид *Ae. squarrosa*, точнее, его подвид *strangulata*, объединившийся в результате амфиполиплоидии с тетраплоидной пшеницей, имевшей геном A^uA^uBB. Эволюция геномов мягкой пшеницы *T. aestivum* посредством полиплоидизации представлена на рис. 4.21.

Как мы видели выше, в результате объединения геномов близких видов, например редьки и капусты, образуются новые формы, имеющие все признаки вида. Таким образом, использование аллополиплоидии дает возможность как синтезировать новые, не существующие в природе виды (этот процесс называется синтезом видов), так и искусственно воссоздавать уже существующие (ресинтез видов). Примерами синтеза видов могут быть рассмотренные выше эксперименты Гудспида, Клаусена, Карпеченко и Астаурова.

В качестве примера ресинтеза видов можно привести работу шведского генетика А. Мюнтцинга (A. Müntzing), выполненную в начале 30-х гг. В результате скрещивания двух видов растений из семейства губоцветных — *Galeopsis pubescens* и *G. speciosa*, имеющих в диплоидном наборе по 16 хромосом, он получил гибрид, у которого было по 8 хромосом от каждого вида, а затем аллотетраплоид (амфидиплоид) с 32 хромосомами. Эта гибридная форма проявила очень большое внешнее сходство с существующим в природе видом *G. tetrahit*, тоже имеющим 32 хромосомы. Оказалось, что «синтетический» вид легко скрещивается с *G. tetrahit*, однако ни «синтетиче-

Рисунок 4.21



Эволюция генома некоторых видов пшениц посредством полиплоидизации
[Ячевская, 1971, с изменениями Н. П. Гончарова, 2000]

ский», ни *G. tetrahit* не скрещиваются с *G. pubescens* или *G. speciosa*. Мюнтцинг пришел к выводу, что природный *G. tetrahit* возник когда-то тем же путем, что и «синтетический» вид, т. е. за счет гибридизации двух других видов. Позже были ресинтезированы многие другие виды: например, слива ($2n = 48$) была получена в 1935 г. В. А. Рыбиным в результате удвоения хромосом гибрида терна ($2n = 32$) с алычой ($2n = 16$), брюква – в результате гибридизации турнепса с капустой и т. д.

4.4.3. Искусственное получение полиплоидов

Все факторы, влияющие на митоз и мейоз, могут вызвать полиплоидию: изменение температуры, радиация, действие наркотиков, механические воздействия — пасынкование, декапитация.

И. И. Герасимов в 1898–1901 гг. впервые экспериментально получил тетраплоидные клетки водоросли спирогиры после воздействия на исходные клетки парами эфира, высокой температурой и др.

Особенно популярен колхицин — алкалоид, выделяемый из растения безвременника осеннего — *Colchicum autumnale*. Впервые его применили А. Ф. Блексли, А. Дж. Эйвери и Б. Небел в 1937 г. Колхицином обрабатывают точки роста растений или инъецируют его животным в водном растворе. Этот алкалоид парализует расхождение хромосом к полюсам (ингибирует присоединение молекул тубулина к микротрубочкам), но не препятствует их репродукции.

4.4.4. Анеуплоидия

К. Бриджес (1916) открыл явление нерасхождения хромосом (см. разд. 3.2), в результате чего обе *X*-хромосомы отходят либо в яйцеклетку (образуется гамета *XX*), либо в направительное тело (гамета *0*). При оплодотворении яйцеклеток *XX* и *0* спермиями, несущими *X*- или *Y*-хромосому, образуются самки *XXX*, *XXY* и самцы *X0*, т. е. анеуплоиды. Все они имеют нормальный диплоидный набор аутосом. В потомстве у этих особей наиболее вероятно образование анеуплоидов из-за нарушения расхождения хромосом в мейозе.

Организм с набором $2n - 1$ называют моносомиком, $2n + 1$ — трисомиком, $2n + 2$ — тетрасомиком, $2n + 3$ — пентасомиком, $2n - 2$ — нуллисомиком.

В 1954 г. американский ученый Е. Сирс после 15 лет работы создал на базе сорта пшеницы «Чайниз Спринг» коллекцию нулли-тетрасомиков, моно- и тетрасомиков. Анеуплоидные линии были получены в СССР в лаборатории О. И. Майстренко в 70-х гг. на других сортах.

У тех организмов, у которых нет дублирующих геномов, как у пшеницы, потеря целой хромосомы, т. е. образование нуллисомиков, почти всегда летальна. Летальны также потери больших кусков хромосом. У дурмана добавление одной хромосомы тоже ведет к изменению фенотипа — формы семенной коробки.

У животных анеуплоиды жизнеспособны, как правило, только в том случае, если анеуплоидия затрагивает половые хромосомы. На-

Таблица 4.6. Нарушения у человека, связанные с различными типами анеуплоидии [Айала, Кайгер, 1988. С. 65]

Хромосомы		Синдром	Частота среди новорожденных
Аутосомы	Трисомия 21	Дауна	1/700
	Трисомия 13	Патау	1/5000
	Трисомия 18	Эдвардса	1/10 000
Половые хромосомы (женщины)	*X0*, моносомия	Шерешевского–Тернера	1/5000
	XXX, трисомия	Мета-женщины Пониженная плодовитость	1/700
	XXXX, тетрасомия		
	XXXXX, пентасомия		
Половые хромосомы (мужчины)	*XYY*, трисомия	Норма	1/1000
	XXY, трисомия	Клайнфельтера	1/500
	XXYY, тетрасомия		
	XXXY, тетрасомия		
	XXXXY, пентасомия		
	XXXXXY, гексасомия		

пример, у мышей и человека жизнеспособны женские особи *X0* (моносомики) и особи мужского пола *XXY* (трисомики по половым хромосомам), пентасомики *XXXXX* — женские особи. Животные-анеуплоиды по аутосомам, как правило, нежизнеспособны. Так, в случае трисомий по 13-й и 18-й хромосомам у человека дети редко выживают после шести месяцев. Среди исключений — трисомик по хромосоме 21 у человека. Он жизнеспособен, но отягощен синдромом Дауна. Хромосомная природа этого заболевания была установлена в лаборатории Ж. Лежена в 1959 г. Особи с синдромом Дауна имеют клинические признаки умственной отсталости, характерный миндалевидный разрез глаз, широкую переносицу, складку века — эпикант, большое расстояние между ноздрями, низкий рост, короткие и короткопалые руки и ноги, особое расположение линий на ладонях, аномалии внутренних органов, особенно сердца и крупных сосудов. Они редко живут более 30 лет. Частота новорожденных с синдромом Дауна (%) резко увеличивается с возрастом матери [Инге-Вечтомов, 1989. С. 519]:

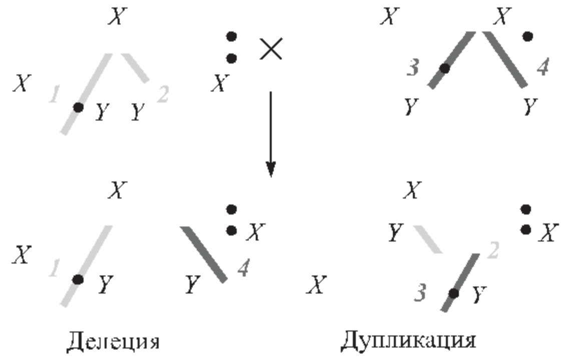
15–19 лет	0,03–0,04
20–24 – « –	0,02–0,04
25–29 – « –	0,04–0,08
30–34 – « –	0,11–0,13
35–39 – « –	0,33–0,42
40 и более	0,80–1,88

Сведения о нарушениях развития человека в результате анеуплоидии представлены в табл. 4.6 и дополнении 4.3.

4.4.5. Сегментальная анеуплоидия у дрозофилы

У дрозофилы получено около 300 транслокаций между *X*- и *Y*-хромосомами, а также между аутосомами и *Y*-хромосомой. У носителей этих транслокаций в геноме можно выделить три элемента: неповрежденная *X*-хромосома, фрагмент дистальной части *X*-хромосомы, сцепленный с частью *Y*-хромосомы (рис. 4.22, *1*), фрагмент *Y*-хромосомы, соединенный с проксимальной частью *X*-хромосомы (*2*). В другой линии точка разрыва может быть дистальнее или проксимальнее (*3* и *4*).

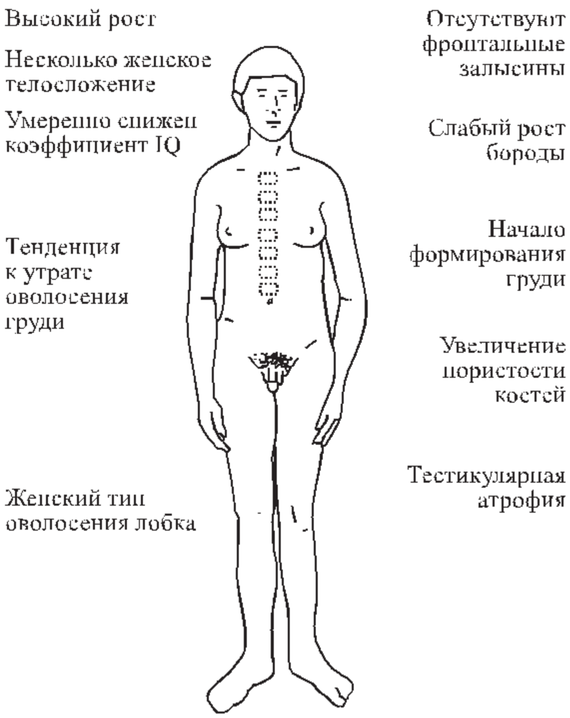
Рисунок 4.22



Возникновение сегментальной анеуплоидии в результате комбинации элементов хромосомы: *X*, *Y* — половые хромосомы, цифрами обозначены транслоцированные хромосомы, черной точкой — центромера

Дополнение 4.3

Признаки, характерные для моносомии по *X*-хромосоме у человека — синдром Шерешевского–Тернера. Впервые синдром был описан в 1925 г. Н. А. Шерешевским, а затем более детально изучен Х. Х. Тернером в 1938 г. [Основы…, 1969. С. 272].



Признаки, характерные для три-, тетра-, пента- и гексасомии по *X*-хромосоме у человека (синдром Клайнфельтера).

Потомство, полученное в результате скрещивания двух этих линий, представлено несколькими классами. При этом комбинация элементов *1* и *4* дает делецию, а комбинация *2* и *3* — дупликацию. Таким образом, в результате скрещивания в потомстве один и тот же сегмент хромосомы дважды представлен в анеуплоидном состоянии: в одной и трех дозах.

4.4.6. Гаплоидия

Гаплоидия — это явление уменьшения числа хромосом, когда в наборе соматической или половой клетки каждая пара гомологичных хромосом представлена лишь одной из них. Гаплоидом называют организм, имеющий в соматических клетках гаплоидный набор негомологичных хромосом.

Естественная гаплоидия встречается в жизненном цикле спорообразующих грибов, бактерий и одноклеточных водорослей.

У высших растений гаплоид впервые был обнаружен у дурмана в 1921 г., затем гаплоиды были найдены у пшеницы, кукурузы. В настоящее время гаплоидия известна для 71 вида из 39 родов и 16 семейств [Лобашев, 1967]. Фенотип гаплоидов имеет следующие особенности:

1. Проявляются рецессивные гены, так как их не прикрывают доминантные аллели.
2. По внешнему виду, как правило, они сходны с соответствующими диплоидными организмами, но мельче их.
3. Гаплоиды перекрестноопылителей маложизнеспособны в отличие от гаплоидов самоопылителей.
4. Клетки имеют меньший размер, что может объясняться уменьшением дозы генов.
5. Гаплоиды почти бесплодны, так как у них в мейозе не образуются полноценные гаметы: хромосомы не имеют гомологов, в силу чего они не конъюгируют и расходятся случайно, образуя несбалансированные гаметы. В редких случаях весь набор хромосом отходит к одному полюсу. Из этих клеток образуются гаметы с нередуцированным гаплоидным числом хромосом. При встрече таких гамет в процессе самоопыления образуется диплоид, гомозиготный по всем генам. Растения, полученные от гаплоида путем вегетативного размножения, имеют фенотип, полностью соответствующий генотипу.

В гаплоидных тканях растений можно улавливать полезные и устранять летальные рецессивные соматические мутации.

4.5. СИСТЕМНЫЕ МУТАЦИИ

Иногда выделяют категорию системных мутаций. В 1940 г. Р. Гольдшмидт предложил называть так структурные перестройки хромосом, связанные с радикальными изменениями во всей системе клеточных реакций.

При системных мутациях не изменяется ни генный состав, ни линейная структура хромосом, ни их число. Системные мутации возникают в результате пространственной реорганизации интерфазных хромосом в ядре за счет изменения хромосомно-мембранных взаимоотношений [Стегний, 1993, 1996].

Литература к разделам 4.4–4.5

Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика: В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 58–71.

Гершензон С. М. Мутации. Киев: Наук. думка, 1991. 111 с.

Дубинин Н. П. Генетика. Кишинев: Штиинца, 1985. С. 272–288.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 347–369, 516–520.

Карпеченко Г. Д. Полиплоидные гибриды. *Raphanus sativus* L. x *Brassica oleracea* L. (К проблеме экспериментального видообразования) // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 461–511. (Тр. по прикл. ботанике, генет., селекц. 1927. Т. 17, вып. 3).

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 349–381, 491–518.

Мюнтцинг А. Генетика, общая и прикладная. М.: Мир, 1967. С. 394–446.

Николаева А. Г. Цитологическое исследование рода *Triticum* // Тр. по прикл. ботан. и селекц. 1922–1923. Т. 13, № 1. С. 33–44.

Основы цитогенетики человека / Ред. А. А. Прокофьева-Бельговская. М.: Медицина, 1969. С. 272–275.

Стегний В. Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 110 с.

Стегний В. Н. Проблема системных мутаций // Генетика. 1996. Т. 32. С. 14–22.

Цитогенетика пшеницы и ее гибридов / Ред. П. М. Жуковский, В. В. Хвостова. М.: Наука, 1971. 243 с.

Генетика — селекции растений / Ред. В. К. Шумный. Новосибирск: Изд. Ин-та цитологии и генетики, 1983. 34 с.

Ячевская Г. Л. Геномный состав мягкой пшеницы // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М.: Наука, 1971. С. 7–29.

Karpechenko G. D. Polyploid hybrids of *Raphanus sativus L.* × *Brassica oleraceae L.* (On the problem of experimental species formation.) // Zeitschrift Fur Induktive Abstammung Und Vererbungslehre. 1928. Bd 48. S. 1–85.

McFadden E. S., Sears E. R. The origin of *Triticum spelta* and its free threshing relatives // J. Hered. 1946. Vol. 37. P. 107–116.

Sears E. R. The aneuploids of common wheat // Mo. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 1954. Vol. 572. P. 1–58.

4.6. НЕНАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Исследователи давно заметили, что многие различия между особями находятся в большой зависимости от условий окружающей среды. Даже при совершенно идентичных генотипах два организма могут быть фенотипически несхожими, если они в течение своего развития по-разному питались, находились при разной температуре или влажности, болели разными болезнями.

Фенотипические ненаследственные различия, возникающие под влиянием преобладающих условий среды у одинаковых в наследственном отношении организмов, К. Нэгели (C. Nägele) в 1884 г. назвал модификациями.

Сведения о модификациях требуются прежде всего для понимания того, как формируется фенотип, поскольку развитие организма определяется не только генами, но и разнообразными воздействиями внешней среды.

Примеры модификаций широко известны и многочисленны.

К. Нэгели переносил альпийские растения в ботанический сад в Мюнхене и установил, что многие изученные им виды изменялись в новых условиях до неузнаваемости: например, низкорослые альпийские виды ястребинки становились крупными, разветвленными и несли много цветков. Если такие растения или их потомков снова пересаживали на каменистую почву, то приобретенные признаки полностью исчезали и они вновь превращались в исходную альпийскую форму [Бляхер, 1971]. У морского червя *Bonellia viridis*, у которого самка и самец имеют одинаковый генотип, развитие пола целиком зависит от условий существования (см. разд. 14.1).

Морфология листьев у водяного лютика и стрелолиста зависит от того, в какой среде, воздушной или подводной, они развиваются (рис. 4.23).

Если надземную часть стебля картофеля искусственно лишить доступа света, на ней развиваются клубни, висящие в воздухе (рис. 4.24).

У камбалы, ведущей донный образ жизни, верхняя сторона тела темная, что делает ее незаметной для приближающейся добычи, а ниж-

Рисунок 4.23

Варьирование морфологии листьев в зависимости от условий произрастания [Гершензон, 1983. С. 242–243].

Вверху — водяной лютик (слева — водные листья, справа — воздушные). Внизу — стрелолист с надводными, плавающими и подводными листьями

Рисунок 4.24

Клубни картофеля, образующиеся над землей при затенении стебля [Гершензон, 1983. С. 248]

няя — светлая. Но если аквариум со стеклянным дном и освещается не сверху, а снизу, то темной становится нижняя поверхность тела.

Кролики горностаевой породы имеют белый мех на теле, кроме конца морды, лап, хвоста и ушей. Если выбрить участок, например, на спине и держать зверька при пониженной температуре (0–1 °C), то на выбритом месте отрастает черная шерсть. Если выщипать часть черных волос и поместить кролика в условия повышенной температуры, то вновь отрастает белая шерсть.

Связано это с тем, что для каждого участка тела характерны свои уровень кровообращения и соответственно температура, в зависимости от чего формируется или деградирует черный пигмент — меланин (рис. 4.25). Генотип при этом остается одинаковым.

Можно перечислить многие другие примеры: всем известны огромные различия в продуктивности кустов картофеля одного и того же сорта, но выросших на освещенных участках и в условиях сильного затенения, в условиях оптимального полива или засухи. У млекопитающих наиболее заметны модификации, возникающие из-за различий в питании.

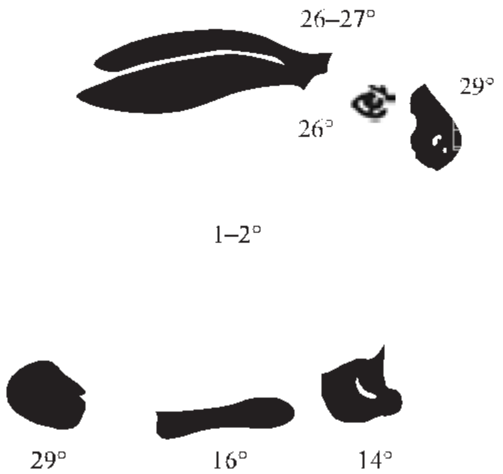
С. М. Гершензон [1983] описывает следующие свойства модификаций:

1. Степень выраженности модификации пропорциональна силе и продолжительности действия на организм фактора, вызывающего модификацию. Эта закономерность коренным образом отличает модификации от мутаций, особенно генных.

2. В подавляющем большинстве случаев модификация представляет собой полезную, приспособительную реакцию организма на тот или иной внешний фактор. Это можно видеть на примере многих из перечисленных выше и многих других модификаций у различных организмов.

3. Адаптивными бывают только те модификации, которые вызываются обычными изменениями природных условий, множество раз встречавшимися особям данного вида на протяжении его прошлой эволюционной истории. Если же организм попадает в необычные об-

Рисунок 4.25



Карта распределения температурных порогов пигментации у кролика [Гершензон, 1983. С. 257].

Цифры показывают температуру, выше которой волосы на данном участке тела будут белыми, ниже которой — черными

стоятельства, с которыми его предкам сталкиваться не приходилось, то возникают модификации, лишенные приспособительного значения.

4. Не имеют приспособительного значения (а нередко представляют даже настоящие уродства) модификации, вызываемые экстремальными воздействиями, с которыми организм не часто сталкивается в природе. Индуцированные таким образом модификации часто называют морфозами. Если действовать на личинок или куколок дрозофилы рентгеновскими или ультрафиолетовыми лучами, а также предельно переносимой температурой, то у развивающихся мух наблюдаются разнообразные морфозы, характер которых зависит от индуцирующего фактора и его интенсивности, а также от стадии развития организма в момент воздействия. Некоторые из этих морфозов очень похожи на изменения, вызываемые мутациями известных генов. Так, под влиянием теплового шока, которому подвергались предкуколки и куколки, были получены мухи с закрученными кверху крыльями, с вырезками на крыльях, с расставленными крыльями, с крыльями малых размеров, фенотипически неотличимые от мух нескольких мутантных линий дрозофилы. Такие модификации, напоминающие проявление известных генов, получили название фенокопий.

5. В отличие от высокой константности мутаций, модификации обладают разной степенью стойкости. Многие из них обратимы, т. е. возникшее изменение постепенно исчезает, если устранено вызвавшее его воздействие. Так, загар у человека проходит, когда кожа перестает подвергаться инсоляции, объем мышц уменьшается после прекращения тренировки и т. д.

Лишь очень редко модификация затрагивает, тоже постепенно сходя на нет, ряд поколений, но поколений не половых, а получающихся при вегетативном размножении. Такие длительные модификации описаны, например, у инфузорий-туфелек. Вначале они выдерживали концентрацию мышьяковистой кислоты не выше 1,1%. Однако, переводя их во все более крепкие растворы, удалось добиться, чтобы они стали переносить даже 5 %-ю концентрацию яда. После прекращения воздействия устойчивость туфелек к мышьяковистой кислоте медленно снижалась, но только через 10,5 мес. она опустилась до исходного уровня, т. е. модификация исчезла лишь приблизительно за 600 вегетативных поколений.

6. В отличие от мутаций, модификации не передаются потомству. Это положение наиболее остро обсуждалось на протяжении всей истории человечества. Полагали, что наследоваться могут любые изменения организма, как врожденные, так и приобретенные в течение жизни. Даже Дарвин признавал возможность наследования некоторых модификационных изменений.

Первый серьезный удар по представлению о наследовании приобретенных признаков нанес А. Вейсман. Иллюстрируя положение о модификациях, он на протяжении 22 поколений отрубал белым мышам хвосты и скрещивал их между собой. В общей сложности было обследовано 1592 особи, и ни разу не было обнаружено укорочения хвоста у новорожденных мышат. В подобном эксперименте, результаты которого были опубликованы в 1913 г., в сущности не было необходимости, поскольку аналогичные события часто происходят и в обычной жизни людей, например, уродства, возникающие в результате ранений, травмы никогда не наследуются. «Результаты преднамеренных повреждений у человека, сделанных из ритуальных или „эстетических“ соображений, — обрезания, протыкания ушей, губ, носовой перегородки, удаления зубов, уродования ступней, черепа и т. д., как известно, также не наследуются» [Бляхер, 1971. С. 98].

В Росии в 30–50-х гг. получили широкое распространение ошибочные утверждения Лысенко и его последователей о наследовании «приобретенных признаков», т. е. модификаций, возникающих в течение жизни особи под влиянием факторов среды, а затем якобы способных адекватно передаваться ее потомкам, т. е. проявляться у них в таком же виде, как

у родителя, даже без действия этих факторов. Множество тщательных опытов, проведенных на разных организмах, показало ненаследуемость модификаций, и исследования такого рода представляют теперь лишь исторический интерес.

В 1956–1970 гг. Ф. Криком сформулирована так называемая «центральная догма молекулярной биологии» (см. разд. 6.2), согласно которой перенос информации возможен только от генетического материала к генным продуктам — белкам, но не в обратном направлении.

Норма реакции. Фенотип формируется за счет взаимодействия двух факторов: генотипа и внешней среды.

Свойство данного генотипа обеспечивать в определенных пределах изменяемость онтогенеза в зависимости от условий среды называют нормой реакции. Иначе говоря, это амплитуда возможной изменчивости в реализации генотипа.

Норму реакции наблюдать лучше всего у организмов с одинаковым генотипом, например у вегетативно размножающихся растений и однояйцевых близнецов (см. разд. 4.7). В этом случае можно выявить норму реакции генотипа в наиболее «чистом» виде.

Полностью охарактеризовать норму реакции, присущую тому или иному генотипу, практически невозможно, так как для этого пришлось бы изучить, как изменяется фенотип особей данного генотипа во всех разнообразных условиях среды, в каких они могут оказаться. Но некоторые частные проявления нормы реакции нередко необходимо знать. Например, в селекции, направленной на создание новых или совершенствование существующих форм возделываемых растений, постоянно возникает потребность установить различия в реакции тех или иных сортов на качество почвы, сроки посева, наличие удобрений.

Какова генетическая обусловленность нормы реакции? Некоторые из факторов, которые, по мнению М. Е. Лобашева [1967], способны обеспечить варьирование признаков в пределах нормы реакции, можно перечислить:

1. Полигенная детерминация признака и реакции организма.
2. Плейотропность действия гена.
3. Зависимость проявления мутации от условий среды.
4. Гетерозиготность организма, вследствие чего у некоторых генов могут изменяться отношения доминирования.
5. Взаимодействие генов, которое происходит на уровне генных продуктов — субъединиц белковых молекул.
6. Альтернативные пути развития в системе онтогенеза и биосинтезов в клетке, когда блокирование одного пути компенсируется другим.

Литература к разделу 4.6

Бляхер Л. Я. Проблема наследования приобретенных признаков. М.: Наука, 1971. 274 с.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 241–259.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 116–126.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 438–453.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 285–579.

4.7. БЛИЗНЕЦЫ

В 1875 г. Ф. Голтон (F. Galton) предложил использовать метод анализа близнецов для разграничения роли наследственности и среды в развитии различных признаков у человека.

Существуют два типа близнецов. Близнецы одного типа ничем не отличаются от братьев и сестер, родившихся от разных беременностей. Такие дети называются неидентичными близнецами. Они появляются из двух разных яйцеклеток, оплодотворенных независимо двумя разными спермиями. Близнецы второго типа исключительно похожи друг на друга, они всегда одного пола. Такие дети получили название идентичных близнецов (рис. 4.26).

Причина их поразительного сходства заключена в совершенно одинаковом генотипе. Идентичные близнецы исходно развиваются из одной яйцеклетки, которая после оплодотворения одним спермием делится на два бластомера, эти бластомеры разъединяются, и каждый из них дает начало отдельному эмбриону. Генетическая информация оплодотворенного яйца благодаря митозу переходит в оба бластомера, которые развиваются затем как два зеркально подобных изображения. В результате можно выяснить роль генотипа и среды, а также определить норму реакции у одинаковых генотипов.

Иногда идентичные близнецы не разделяются полностью, а рождаются соединенными друг с другом — это так называемые сиамские близнецы. Встречаются всевозможные степени соединения, от почти полного разделения до почти полного слияния, когда разделенными остаются только головы или ноги. Иногда два близнеца различаются по величине тела

Рисунок 4.26

Идентичные близнецы Лоис и Луиз.
Две девочки были разделены родителями в возрасте 8 дней и воспитывались порознь. За исключением кратких встреч, они не общались друг с другом до поступления в колледж в возрасте 18 лет [Srb et al., 1965. P. 518]

и по степени развития: один может быть вполне нормальным, а другой — лишь частично сформировавшимся, прикрепленным к первому наподобие паразита.

Внешнее сходство или различие близнецов не всегда является абсолютно надежным для решения вопроса о том, являются они монозиготными или дизиготными. В качестве дополнительных методов используют исследования плаценты и метод трансплантации тканей.

Установлено, что каждый из дизиготных близнецов имеет свои собственные оболочки — амнион и хорион, хотя при очень близкой имплантации зигот плаценты могут срастись. Значительная часть монозиготных близнецов также имеет свои хорионы и амнионы, а некоторые имеют и свои плаценты. Все монохорионные близнецы являются однояйцевыми, а около 70 % однояйцевых близнецов имеют один хорион.

При определении типа зиготности используют также признаки, контролируемые одним геном, такие как группы крови и группы белков сыворотки.

Последними «инстанциями», куда можно апеллировать при решении вопроса о типе зиготности, является трансплантация кожи или методы генной инженерии. У монозиготных близнецов реципрокные трансплантанты приживаются, а у дизиготных — отторгаются. Статистическое изучение большого материала показывает, что однояйцевые близнецы составляют примерно 25 % от общего числа двоен. На 1000 родов приходится 2–4 однояйцевые пары близнецов.

В современной генетике использование близнецов для выяснения роли генотипа и среды в реализации генетической информации основывается на следующем:

Таблица 4.7. Конкордантность некоторых признаков человека у близнецов [Гершензон, 1983. С. 511]

Признаки	Конкордантность, %: у однояйцевых близнецов	у разнояйцевых близнецов
Нормальное развитие		
Группы крови	100	64
Форма бровей	100	51
Цвет глаз	99,5	28
Цвет волос	97	23
Папиллярные линии кистей рук	92	40
Патология		
Косолапость	23	2
Грыжа спинного мозга	77	33
Синдром Дауна	89	7
Рахит	88	22
Паралитический полиомиелит	36	6
Корь	95	87
Скарлатина	84	47
Дифтерит	50	38
Рак	16	14
Эпилепсия	67	3
Слабоумие	91	53
Шизофрения	80	13
Маниакально-депрессивный психоз	77	19

1. Поскольку однояйцевые близнецы имеют одинаковые генотипы, очевидно, что всякое несходство членов пары вызывается либо влиянием внутриутробной жизни, либо условиями окружающей среды после их рождения.

2. Наиболее ярко выявляется роль генотипа при сравнении однояйцевых близнецов, разлученных с детства и воспитывающихся в разных семьях в разных условиях.

3. Разнояйцевые близнецы обладают тем достоинством для генетических исследований, что на обоих членов пары одинаково действуют такие факторы, как возраст матери, число предыдущих родов и общие условия проживания.

В генетических исследованиях на близнецах необходимо сравнительно изучать все три типа ситуаций. Только тогда можно оценить

как влияние разных условий среды на одинаковые генотипы, так и проявление разных генотипов в одинаковых условиях среды.

Если изучаемый признак проявляется у обоих близнецов пары, это называется конкордантностью, если же только у одного из них — дискордантностью (табл. 4.7).

Сравнение данных, приведенных в таблице, позволяет составить представление о соотношении роли наследственности и среды. Для этого предложен ряд формул, дающих, однако, лишь приблизительную оценку. Вот одна из них:

$$\frac{H}{C} = \frac{(100 - b) - (100 - a)}{100 - a},$$

где H — наследственность, C — среда; a — конкордантность у однояйцевых, b — у разнояйцевых близнецов одинакового пола, %.

Если с помощью этой формулы обработать некоторые данные таблицы 4.7, получаются следующие значения:

Косолапость: $\frac{H}{C} = \frac{98 - 77}{77} = 0{,}27$

Грыжа спинного мозга: $\frac{H}{C} = \frac{67 - 23}{23} = 1{,}91$

Синдром Дауна: $\frac{H}{C} = \frac{93 - 11}{11} = 7{,}45$

Дифтерит: $\frac{H}{C} = \frac{62 - 50}{50} = 0{,}24$

Корь: $\frac{H}{C} = \frac{13 - 5}{5} = 1{,}60$

Скарлатина: $\frac{H}{C} = \frac{53 - 16}{16} = 2{,}31$

Очевидно, что косолапость определяется главным образом влиянием среды. В возникновении синдрома Дауна преобладающее значение имеет наследственность, а грыжа спинного мозга занимает промежуточное положение [Гершензон, 1983].

Литература к разделу 4.7

Вилли К. Биология. М.: Мир, 1966. С. 537–539.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 510–512.

Дубинин Н. П. Горизонты генетики. М.: Просвещение, 1970. С. 402–409.

Канаев И. И. Близнецы и генетика. Л.: Наука, 1968. С. 66–101.

МакКьюсик В. Генетика человека. М.: Мир, 1967. 200 с.

Фогель Ф., Мотульский А. Генетика человека: В 3 т. М.: Мир, 1989–1990. Т. 1. 308 с. Т. 2. 378 с. Т. 3. 366 с.

Sinnot E. W., Dunn L. C., Dobzhansky T. Principles of Genetics. 5th ed. New York; Toronto; London: McGraw-Hill, 1958. P. 133–142.

Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S. General genetics. 2nd ed. San Francisco; London: Freeman and Co., 1965. P. 516–524.

Глава 5
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ

5.1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Определяя понятие генетического анализа, А. С. Серебровский писал: «Генетическим анализом мы называем систему опытов, наблюдений и вычислений, имеющих целью разложение свойств (признаков) организма на отдельные наследственные элементы, „отдельные признаки“, и изучение свойств соответствующих им генов» [Серебровский, 1970. С. 5].

По мнению М. Е. Лобашева, с помощью генетического анализа исследуется качественный и количественный состав генотипа, проводится анализ его структуры и функционирования.

Методы генетического анализа разнообразны, но главным образом это система всевозможных скрещиваний, причем любая работа проходит следующие этапы:

1. Выясняется, наследуется ли признак, имеет ли он контрастные формы.
2. Выясняется число генов, контролирующих развитие данного признака.
3. Выясняется, есть ли взаимодействие между этими генами.
4. Определяются группы сцепления (хромосомы) и картируются гены в хромосоме.
5. Определяются характеристики генов.

В настоящее время в понятие генетического анализа входит клонирование гена, определение последовательности нуклеотидов ДНК, выяснение интрон-экзонной структуры гена и времени его экспрессии в онтогенезе.

Картирование генов сначала с точностью до группы сцепления, а затем уже в определенном участке хромосомы является важнейшей частью генетического анализа.

У дрозофилы анализ проходит следующие этапы:

1. Получение мутаций, спонтанных или индуцированных.
2. Тестирование мутаций на аллелизм.
3. Картирование гена в группе сцепления.
4. Построение кроссоверных карт генов.
5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек.
6. Картирование генов с помощью гибридизации *in situ.*

Не обязательно проводить все эти этапы. Если в руках исследователя есть ДНК данного гена, то для его хромосомной локализации легче сразу провести гибридизацию *in situ.* Однако чаще всего именно для получения ДНК гена необходимо провести все этапы генетического анализа.

Для изучения наследования признаков у человека гибридологический анализ не применим. Его успешно заменяет генеалогический метод. Генеалогическое древо, или родословная, строится, начиная от персоны, обладающей определенным признаком.

У организмов, генетика которых развита недостаточно хорошо, картирование генов проводят с помощью методов клеточной биологии.

5.2. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАЦИЙ

Спонтанно возникшие мутации выявляют, главным образом, в результате обследования диких популяций изучаемого организма.

Индуцированные мутации получают с помощью различных схем скрещиваний, в которых используют мутагены. У дрозофилы используют такие схемы скрещиваний, как *ClB* для *X*-хромосомы или *Cy L/Pm* для второй хромосомы (см. разд. 4.2.1). Известны и другие схемы.

Если предварительно известны делеции в определенном районе хромосомы, существуют специальные схемы скрещиваний, позволяющие буквально «насытить» мутациями этот район. Такой метод был разработан в 1938 г. С. И. Алиханяном в СССР, а затем был успешно применен американскими учеными Б. Джаддом и его сотрудниками в 1972 г. (рис. 5.1). Самок, гомозиготных по балансерной линии *Basc*, несущей доминантную мутацию *Bar* (*B*), скрещивают с обработанными мутагеном самцами. В потомстве отбирают самок, несущих хромосому *Basc* и мутагенизированную хромо-

сому, и скрещивают их индивидуально с самцами, имеющими делецию в *X*-хромосоме и дупликацию *X*-хромосомного материала в *Y*-хромосоме. Наличие дупликации в *Y*-хромосоме, «перекрывающей» нехватку генов в *X*-хромосоме, позволяет этим самцам выжить.

В F_2 в каждой индивидуальной пробирке анализируют расщепление среди самок. Если в мутагенизированной *X*-хромосоме возникла летальная мутация в участке, удаляемом делецией, то самки *Bar*$^+$ гибнут. В то же время самцы *Bar*$^+$ являются носителями этой летали.

В последние годы мутации у дрозофилы индуцируют с помощью мобильного элемента генома (*P*-элемента). Наличие мутаций, индуцированных таким образом, позволяет быстро выделить и клонировать ДНК данного гена.

Рисунок 5.1

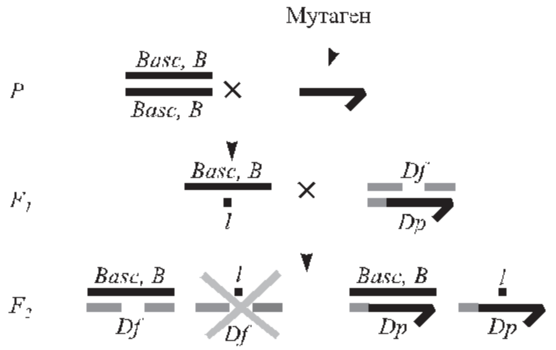
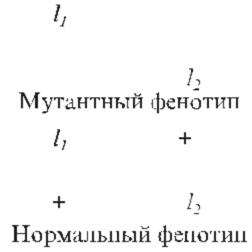


Схема скрещиваний для получения мутаций в определенных районах *X*-хромосомы дрозофилы [Judd et al., 1972]

5.3. ТЕСТИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ НА АЛЛЕЛИЗМ

В результате мутагенизации, как правило, получают большое число мутаций. Для того чтобы определить, сколько и каких генов они затрагивают, проверяют все мутации в гетерозиготе во всех парных сочетаниях с целью установить, нарушают мутации одну и ту же функцию или разные. Согласно этому функциональному критерию, если не поврежденные мутациями участки генов взаимодействуют комплементарно и образуется гибрид дикого типа, то мутации затрагивают разные гены. Если же у гибрида получается мутантный фенотип, это означает, что обе мутации затрагивают один и тот же ген (рис. 5.2).

Рисунок 5.2



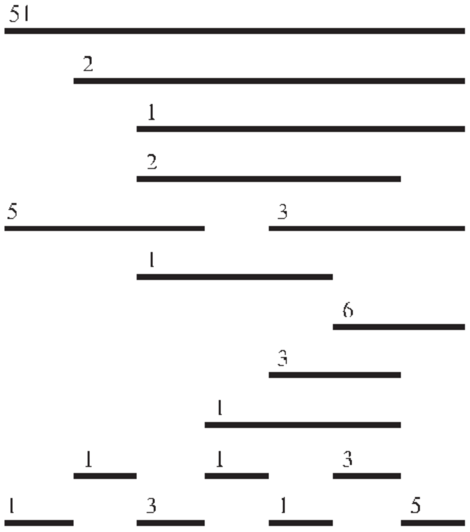
Функциональный тест на аллелизм.
Вверху — гетероаллельная комбинация, или компаунд, внизу — классическая дигетерозигота

5.4. МЕЖАЛЛЕЛЬНАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ

При межаллельной комплементации два мутантных аллеля совместно способны обеспечить образование нормально функционирующего продукта, а по отдельности ни один из них это сделать не в состоянии. Как находят факты межаллельной комплементации?

В генетических экспериментах очень часто выделяют ряд мутаций, имеющих, по крайней мере на первый взгляд, сходное фенотипическое выражение, локализующихся в одном и том же небольшом генетическом сегменте и не дающих комплементации при проверке на аллелизм. Такие мутации приписывают одному и тому же гену. Затем индуцируют все новые и новые мутации такого же типа и, когда их число становится достаточно большим, выясняется, что, хотя почти все они по-прежнему некомплементарны, в некоторых комбинациях можно обнаружить комплементарность. Явление это широко распространено. Часто бывает так, что наряду с классами мутаций, комплементарных между собой в любых парных сочетаниях, существуют и другие мутации, не комплементарные мутациям двух или более комплементарных классов (перекрывающиеся с ними на комплементационных картах), а также мутации (они обычно составляют абсолютное большинство), перекрывающиеся со всеми остальными. Комплементационные взаимоотношения всей совокупности мутантов можно представить в виде схемы, или комплементационной карты, которая очень часто, хотя и не всегда, бывает линейной. В основу построения комплементационной карты положен следующий принцип: все взаимно комплементарные мутации изображаются в виде неперекрыва-

Рисунок 5.3



Карта комплементации мутаций гена *ad-4* у *Neurospora crassa* [Финчем, 1968. С. 54]. Цифры указывают число ауксотрофных мутаций в каждой группе комплементации

Рисунок 5.4

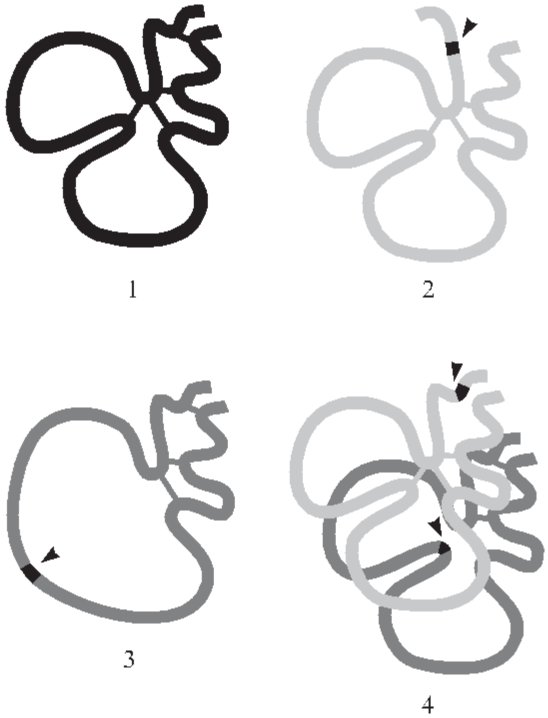


Схема комплементации двух полипептидных цепей молекулы белка, состоящей из двух одинаковых цепей [Гершензон, 1983. С. 399]: *1* — нормальная конфигурация цепи; *2*, *3* — обе цепи имеют по-разному искаженную конфигурацию вследствие двух мутаций; *4* — при сборке молекулы белка цепи взаимно исправляют свою конфигурацию и молекула оказывается функционально нормальной. Стрелки указывают положение аминокислот, измененных мутацией

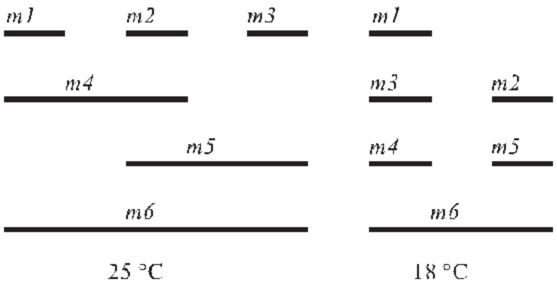
ющихся линий, а все некомплементарные — в виде перекрывающихся (рис. 5.3). Группа мутаций, обнаруживающих одинаковые комплементационные отношения со всеми другими мутациями, называется группой комплементации.

Предпосылками межаллельной комплементации являются независимое действие аллелей и наличие гибридного белка — продукта данного гена. Согласно гипотезе Кэтчсайда и Овертона [Финчем, 1968], среди продуктов гена существует два типа полипептидных цепей. Предполагается, что одной из стадий в образовании фермента является агрегация не менее чем двух цепей. В некоторых случаях объединяются гетерологичные продукты. Затем, по-видимому, происходит специфическое свертывание полипептидных цепей. У каждого мутанта имеется какой-то дефект, обусловливающий не совсем правильное свертывание и, как следствие, образование белка, достаточно сильно отличающегося от нормального фермента и потому лишенного специфической активности. Одна из причин, по которым разные мутантные полипептидные цепи могут оказаться комплементарными, — это способность к кооперативному свертыванию в гетерологичных агрегатах (рис. 5.4).

Одной из важных характеристик межаллельной комплементации является изменение карты комплементации при варьировании температуры (рис. 5.5).

Существование межаллельной комплементации требует более тщательного анализа аллелизма мутаций. Скрещивания необходимо проводить при разных температурах: у дрозофилы это 18 °С, 25 °С и 29 °С.

Рисунок 5.5



Карты комплементации одних и тех же мутаций при разных температурах

5.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ СЦЕПЛЕНИЯ

Если признак передается только от отца к сыну, то весьма очевидно, что данный ген картирован в *Y*-хромосоме. Например, у человека встречается такой признак, как волосатые уши. Он бывает только у мужчин и передается по мужской линии. Ген картирован в *Y*-хромосоме.

Многочисленные «сцепленные с полом» гены локализованы в *X*-хромосоме. Характер их наследования отличается от всех других. Реципрокные скрещивания дают разные результаты: в одном направлении скрещивания потомки F_1 единообразны, в другом наблюдается расщепление, причем дочери похожи на отца, а сыновья на мать (наследование крест-накрест, или крисс-кросс). К числу таких признаков относятся среди прочих гемофилия и дальтонизм у человека.

Для локализации гена в аутосоме используют тесторные линии.

5.5.1. Определение группы сцепления с помощью рецессивных маркеров

В качестве линии-тестора можно взять линию, в которой маркированы все хромосомы дрозофилы, кроме половой: мутация *brown* (*bw*, коричневые глаза) — во второй хромосоме, мутация *ebony* (*e*, черное тело) — в третьей и *eyeless* (*ey*, отсутствие глаз) — в четвертой хромосоме.

Самок тесторной линии скрещивают с носителем картируемой мутации. В данном случае это доминантная мутация *Mut*, локализованная в третьей хромосоме (рис. 5.6). Самцов F_1 нужно скрестить с самками, взятыми вновь из тесторной линии. Если в F_2 мутация *Mut* проявляется только с маркерами второй и четвертой хромосом (*bw* и *ey*) и никогда — с маркером третьей, значит, эта мутация располагается в третьей хромосоме. Если картируемая мутация никогда не проявляется одновременно

Рисунок 5.6

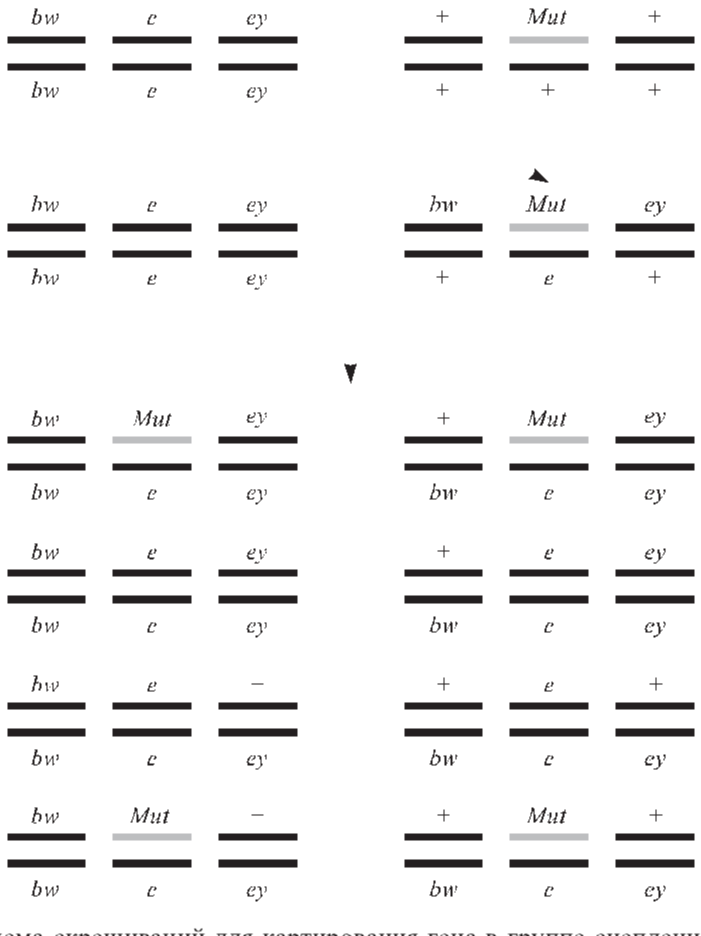


Схема скрещиваний для картирования гена в группе сцепления с помощью рецессивных маркеров у дрозофилы

с маркерами второй или четвертой хромосом, то она локализована соответственно во второй или четвертой хромосоме.

5.5.2. Определение группы сцепления с помощью доминантных маркеров

Можно использовать линию с четырьмя доминантными маркерами: *L* (*Lobe*, дольчатые глаза), *Cy* (*Curly*, загнутые вверх крылья), *D* (*Dichaete*, расставленные крылья, см. рис. 4.1), *Sb (Stubble,* укороченные толстые щетинки). Все четыре мутации доминантны, но с рецессивным летальным действием, т. е. гомозиготные мутанты гибнут. Хромосомы 4 и *X* в данной схеме не метятся.

Скрещивают особей этой линии с гомозиготой по картируемой рецессивной мутации. Назовем ее *mut* и предположим, что она во второй хромосоме (рис. 5.7).

В потомстве F_1 отбирают самцов любого из классов, затем ставят анализирующее скрещивание.

Если мутация *mut* локализована в хромосоме 2 (как предполагается на рис. 5.7), то она проявится у мух с признаком *Sb* или *D* или у мух без маркерных признаков и не проявится у мух с маркерами второй хромосомы.

Если мутация *mut* локализована в хромосоме 3, то она проявится у мух с признаком *L* или *Cy* и у мух без маркерных признаков, но не проявится у мух с маркерами третьей хромосомы.

Если мутация *mut* локализована в хромосоме 4, то она проявится у половины мух с признаком *L* или *Cy*, у половины мух с признаком *Sb* или *D* и у половины мух без маркеров.

Рисунок 5.7

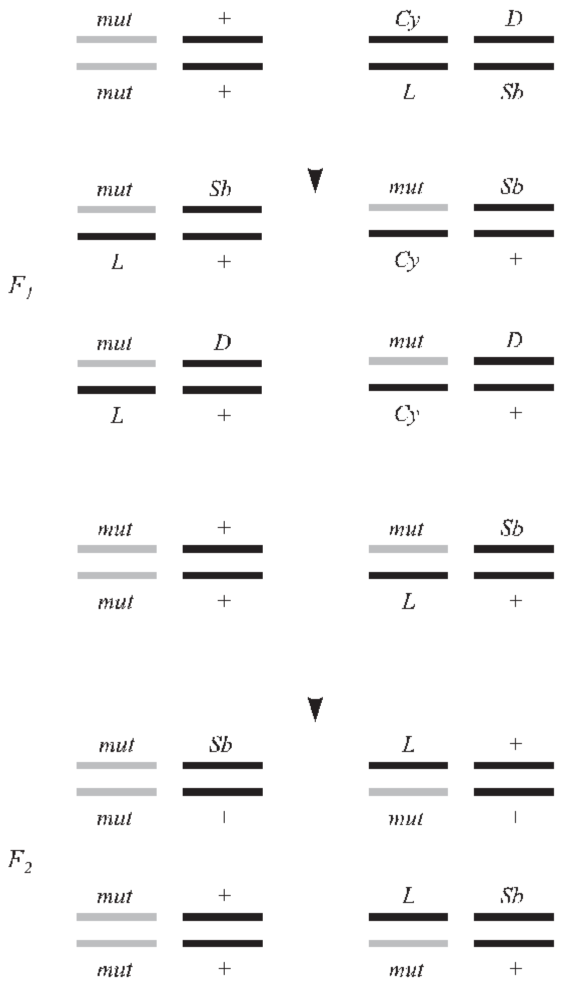


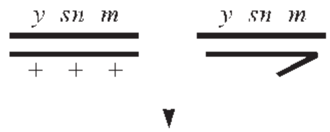
Схема скрещиваний для картирования гена в группе сцепления с помощью доминантных маркеров у дрозофилы

5.6. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНА В ГРУППЕ СЦЕПЛЕНИЯ

5.6.1. Классический метод

Допустим, нужно картировать мутацию, определяющую у дрозофилы желтый цвет тела — *yellow* (*y*). Для локализации *y* эту линию нужно скрестить с тесторной, несущей как минимум два маркерных гена: *sn* (*singed*) — опаленные щетинки и *m* (*miniature*) — маленькие крылья. Вместе с *y* их будет три в одной хромосоме. Это как раз тот минимум, который необходим для точной локализации гена.

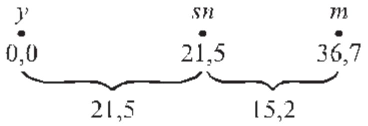
Ход эксперимента следующий:



Некроссоверные потомки	*y*	*sn*	*m*	7 337	14 671
	+	+	+	7 334	(66,4 %)
Одиночные кроссоверы на участке *y–sn*	*y*	+	+	1 994	4 066
	+	*sn*	*m*	2 072	(18,4 %)
Одиночные кроссоверы на участке *sn–m*	*y*	*sn*	+	1 360	2 674
	+	+	*m*	1 314	(12,1 %)
Двойные кроссоверы	*y*	+	*m*	335	685
	+	*sn*	+	330	(3,1 %)
Всего потомков				22 096	

Эти данные свидетельствуют о том, что всего кроссоверов на участке *y–sn* было 21,5 % (18,4 + 3,1), а на участке *sn–m* — 15,2 % (12,1 + 3,1).

Чтобы результаты не противоречили друг другу, гены на карте хромосомы можно расположить так:



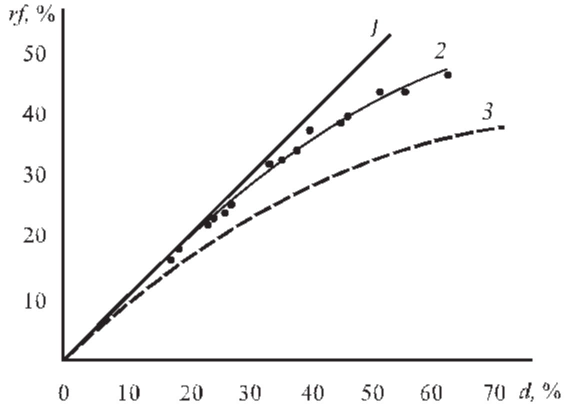
Стёртевант, не делая, однако, различий между частотой появления рекомбинантов в анализирующем скрещивании (*rf*) и собственно кроссинговера, пришел к выводу, что расстояние между двумя генами равно сумме (в некоторых случаях — разности) расстояний между ними и любым третьим геном, расположенным в той же группе сцепления (закон аддитивности): $rf_{ac} = rf_{ab} + rf_{bc}$. Закон аддитивности показывает, что *rf* есть линейная функция расстояния. Однако эти величины совпадают лишь в том случае, если обе составляющие (rf_{ab} и rf_{bc}) вместе не превышают десятка сантиморган. На более протяженных участках хромосом экспериментально определяемое значение rf_{ac} оказывается всегда меньше теоретически ожидаемого ($rf_{ab} + rf_{bc}$).

Основываясь на законе аддитивности, расстояние rf_{ay} можно определить двумя способами: непосредственно измерив его в соответствующем скрещивании ($a \times y$) или суммировав значения *rf*, определяемые на небольших участках в интервале между генами *a* и *y* при наличии промежуточных маркеров *b*, *c*, ... *x*. Понятно, что при таком последовательном суммировании даже небольших расстояний мы

Дополнение 5.1

Идея построения генетических карт по результатам рекомбинационного анализа принадлежит А. Стёртеванту. Вот что он пишет в своих воспоминаниях. «В 1909 году Кастл опубликовал диаграммы, показывающие взаимоотношение между генами, определяющими окраску кролика... Они были восприняты как попытка выявить пространственные взаимоотношения в ядре. В конце 1911 года в разговоре с Морганом об этой попытке... я внезапно понял, что вариации в силе сцепления, уже приписанные Морганом различиям в пространственном расположении генов, открывают возможность определения последовательности в линейном измерении хромосомы. Ночью я сделал первую карту» [Sturtevant, 1965. P. 305. — Из: Кушев, 1971. С. 14].

Рисунок 5.8



Картирующие функции:

1 — кривая, описываемая функцией Стёртеванта ($rf = d$); *2* — эмпирическая кривая, построенная по точкам, ордината каждой из которых представляет собой частоту рекомбинации для данной пары мутантов, а абсцисса — сумму частот рекомбинаций для небольших последовательных интервалов между данными маркерами; *3* — кривая, описываемая функцией Холдейна [Кушев, 1971. С. 17]

можем получить значения общей длины карты данной хромосомы (если *a* и *y* расположены на ее концах) в сотни и тысячи сантиморган. В то же время частота рекомбинации между *a* и *y* не может превышать 50 %, что наблюдается при независимом наследовании признаков.

Отступления от аддитивности на больших расстояниях Стёртевант приписал наличию двойных кроссинговеров. Второй кроссинговер между *a* и *c* ликвидирует последствия первого: рекомбинанты по *a* и *c* не появляются, хотя рекомбинация имела место (см. разд. 3.3.2.3). Если интервал между генами достаточно большой, то число четных обменов равно числу нечетных, и наступает рекомбинационное равновесие (*rf* = 50 %). Таким образом, на длинных отрезках хромосомы вероятность рекомбинации не является мерой генетического расстояния.

При картировании генов, расположенных далеко друг от друга, выделяют два понятия: расстояние на карте (*d*) и частота рекомбинации (*rf*). Расстояние подсчитывается на основании определения суммарной частоты кроссоверов, частота рекомбинации учитывает только те кроссоверы, которые выявляются по обмену маркеров.

Часто взаимоотношения между расстоянием *d* и частотой рекомбинаций *rf* выражаются картирующей функцией (рис. 5.8).

Картирующая функция, предложенная Дж. Холдейном (J. Haldane), описывается формулами

$$rf = \frac{1}{2}(1 - e)^{-2d} \quad \text{или} \quad d = -\frac{1}{2}\ln(1 - 2rf),$$

где e — основание натуральных логарифмов, d — расстояние на карте, rf — частота рекомбинации маркеров.

Функция Холдейна показывает, что по мере увеличения расстояния rf асимптотически приближается к 50 %. Значения rf и d практически совпадают лишь на отрезке кривой до $rf = 10$ % [Кушев, 1971].

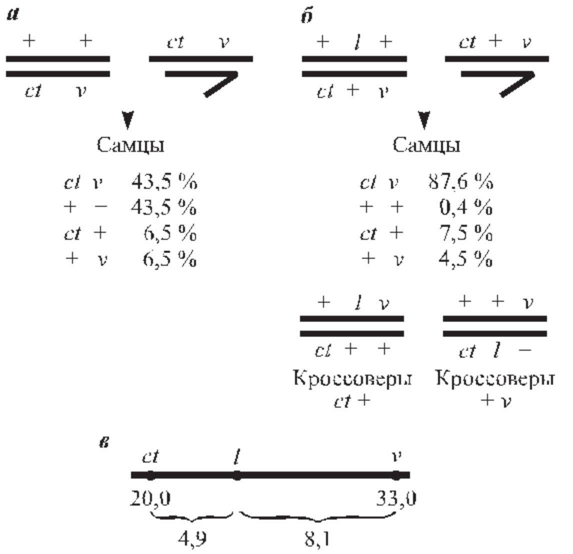
В настоящее время кроссоверные генетические карты составлены для очень многих организмов [см. справочники: Захаров, 1979; O'Brien, 1982; Lindsley, Zimm, 1992].

5.6.2. Картирование летальных мутаций

Рассмотрим принцип картирования леталей на примере мутации, локализованной в *X*-хромосоме. Для этого используют тесторную линию, имеющую хромосому с двумя видимыми маркерами, в данном случае *ct* (*cut*, вырезки на крыльях) и *v* (*vermilion*, алые глаза). Одновременно ставят два скрещивания. В отсутствие летали (рис. 5.9, *а*) число мух в комплементарных классах среди кроссоверов и некроссоверов равно. При наличии летали в *X*-хромосоме такого равенства нет и самцы дикого типа встречаются очень редко. Летальная мутация может находиться в одном из трех положений: слева от *ct*, между *ct* и *v* и правее *v*. В скрещивании *а* частота кроссоверов между *ct* и *v* составляет 13 %, а некроссоверов — 87 %, при этом в скрещивании *б* происходит потеря некроссоверного класса ++, что свидетельствует о локализации летали между двумя маркерами. Более того, кроссоверов между *l* и *v (ct+)* выживает несколько больше — 7,5 %, чем между *ct* и *l (+v)* — 4,5 %. Расстояние между *ct* (положение на генетической карте 20,0) и *v* (33,0) составляет 13 сМ. Леталь картируется в этом промежутке, который нужно поделить в соответствии с частотами кроссинговера — 4,5×13/12 и 7,5×13/12, т. е. леталь будет располагаться на расстоянии в 4,9 сМ от *ct* и 8,1 — от *v* (см. рис. 5.9, *б*).

Для окончательного картирования леталей следует использовать делеции и дупликации (см. рис. 4.15).

Рисунок 5.9



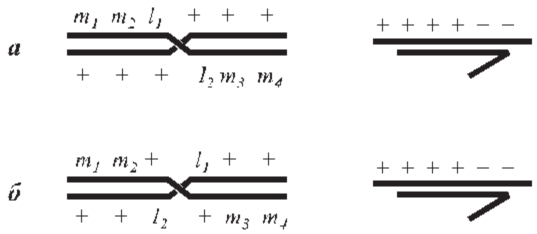
Схемы скрещивания для картирования летальной мутации в *X*-хромосоме дрозофилы: *а* — в отсутствие, *б* — при наличии летали; *в* — локализация летали относительно маркеров *ct* и *v*

5.6.3. Селективные схемы скрещивания

В некоторых случаях особенности организации гена, участка хромосомы или самой хромосомы позволяют составить схемы скрещиваний, позволяющие анализировать огромные выборки потомков, в результате чего появляется возможность картировать мутации на очень коротких расстояниях и даже внутри гена. Известны схемы, позволяющие надежно картировать взаимное расположение генов, лежащих рядом, и определять расстояние между ними, например, картирование леталей, локализованных очень близко друг к другу в *X*-хромосоме дрозофилы. В этом случае летали (l_1, l_2) маркируются рецессивными видимыми мутациями, часть которых расположена дистальнее (m_1, m_2), часть — проксимальнее (m_3, m_4) леталей (рис. 5.10).

Получают самок, гетерозиготных по этим леталям, их скрещивают с любым самцом и анализируют потомство: подсчитывают число самок, а самцы-некроссоверы все гибнут, так как обе *X*-хромосомы у самки-матери не-

Рисунок 5.10



Селективная схема скрещиваний, с помощью которой картируют близко расположенные летали: *а* — леталь l_1 расположена слева от летали l_2; *б* — леталь l_1 расположена правее, чем леталь l_2

Таблица 5.1. Соотношение кроссоверных и молекулярных карт [Lewin, 1994. С. 128]

Виды	Размер генома в парах нуклеотидов (*а*)	Число кроссоверных единиц карты в геноме (*б*)	Размер кроссоверной единицы в парах нуклеотидов (*а*/*б*)
Фаг Т4	$1{,}6\times10^5$	800	200
E. coli	$4{,}2\times10^6$	1 750	2 400
Дрожжи	$2{,}0\times10^7$	4 200	5 000
Грибы	$2{,}7\times10^7$	1 000	27 000
Нематоды	$8{,}0\times10^7$	320	250 000
Дрозофила	$1{,}4\times10^8$	280	500 000
Мышь	$3{,}0\times10^9$	1 700	1 800 000
Человек (муж.)	$3{,}3\times10^9$	2 809	1 200 000
Человек (жен.)	$3{,}3\times10^9$	4 782	700 000

сут летали. Выживают только кроссоверы ++++++, т. е. если кроссинговер произошел между леталями и эти летали расположены в том порядке, как указано на рис. 5.10, *а*. Если l_2 расположена левее l_1, выживают кроссоверы $m_1 m_2 + + m_3 m_4$ (рис. 5.10, *б*).

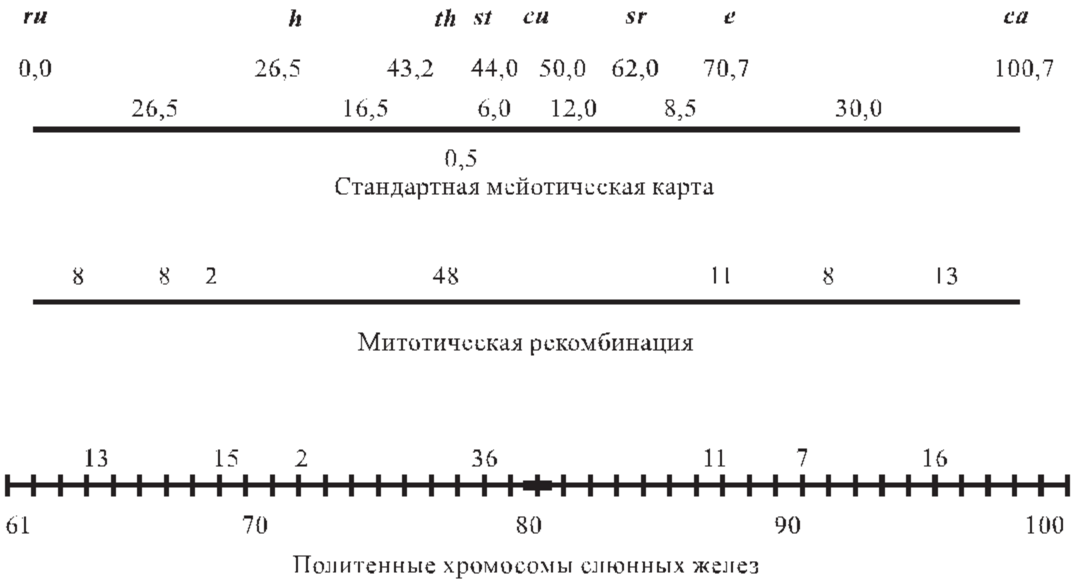
Расстояние между леталями определяется как отношение удвоенного числа выживших самцов к числу самок в потомстве [Lefevre, 1971; Zhimulev et al., 1981].

5.6.4. Соотношение кроссоверной и молекулярной карт генов

Поскольку на частоту кроссинговера влияют разнообразные факторы, всегда остается ощущение, что кроссоверные расстояния относительны и они не имеют соответствия каким-то реальным физическим единицам, например числу нуклеотидов ДНК. Обычно, чтобы получить данные о таком соотношении, значение размера генома (в парах нуклеотидов) делят на общую длину кроссоверной карты (табл. 5.1).

Подобные данные позволяют заключить, что частота генетической рекомбинации значительно выше у прокариот и низших эукариот. Так, дрожжи имеют кроссоверную карту размером 4200 единиц, в то время как дрозофила или нематода (представитель круглых червей) — 280 и 320 соответственно. Как следствие, у прокариот число нуклеотидов на единицу карты значительно ниже, чем у эукариот.

Рисунок 5.11



Сопоставление расстояний между генами третьей хромосомы дрозофилы, выявленных с помощью мейотического и митотического кроссинговера [Ashburner, 1989. P. 912]

5.6.5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек

Мутации лучше всего картировать, используя наборы делеций (см. рис. 4.14–4.16) и дупликаций. С помощью транслокаций (изменяется сцепленность наследования) можно определять группы сцепления (см. разд. 4.3.2).

5.6.6. Картирование генов с помощью соматического кроссинговера

Порядок генов в хромосоме можно определить и с помощью митотического кроссинговера. Однако расстояния получаются совершенно иные (рис. 5.11).

Литература к разделам 5.1–5.6

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 135–169.

Захаров И. А. Генетические карты высших организмов. Л.: Наука, 1979. 157 с.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 144–169.

Кушев В. В. Механизмы генетической рекомбинации. Л.: Наука, 1971. 247 с.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 226–257.

Серебровский А. С. Генетический анализ. М.: Наука, 1970. 342 с.

Тихомирова М. М. Генетический анализ. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 280 с.

Финчем Дж. Генетическая комплементация. М.: Мир, 1968. 183 с.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989. P. 912.

Judd B. H, Shen M. W., Kaufman T. C. The anatomy and function of a segment of the *X* chromosome of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1972. Vol. 71. P. 139–156.

Lefevre G. Jr. Salivary chromosome bands and the frequency of crossing over in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1971. Vol. 67. P. 497–513.

Lindsley D. L., Zimm G. G. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego; New York; Boston; London: Academic Press, 1992. 1133 p.

O'Brien S. Genetic maps. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Vol. 2. 405 p.

Zhimulev I. F., Pokholkova G. V., Bgatov A. V., Semeshin V. F., Belyaeva E. S. Fine cytological analysis of the band 10A1-2 and the adjoining regions in the *Drosophila melanogaster X* chromosome. II. Genetical analysis // Chromosoma. 1981. Vol. 82. P. 25–40.

5.7. МЕТОД АНЕУПЛОИДНЫХ ТЕСТЕРОВ

Анеуплоиды — это особи, в геноме которых отсутствует какое-то число хромосом или присутствуют дополнительные. Если недостает двух гомологичных хромосом, таких особей называют нуллисомиками, одной хромосомы — моносомиками, при наличии одной лишней гомологичной хромосомы — трисомиками (см. разд. 4.4.4).

5.7.1. Нуллисомия

Если скрещивание линии, содержащей картируемую мутацию *r*, с тестерной линией нулли-А дает в F_1 нормальных потомков,

$$P \quad 0_A0_A \times rr$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad \text{дикий тип}$$

то в этом случае мутация *r* не картируется в хромосоме А и нужно взять следующую линию-тестор, например нулли-В:

$$P \quad 0_B0_B \times rr$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad \text{мутантный фенотип } r$$

В этом скрещивании проявляется мутантный фенотип *r*, значит, мутация картирована в хромосоме В. Полностью генотипы для первого скрещивания записываются следующим образом:

$$P \quad 0_A0_AB_RB_R \times AAB_rB_r$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad A0_AB_RB_r$$
$$\text{мутантный фенотип } r$$

Для второго скрещивания:

$$P \quad AA0_B0_B \times AAB_rB_r$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad AAB_r0_B$$
$$\text{проявляется мутантный фенотип } r$$

Иногда картирование производится уже в процессе создания линий нуллисомиков. Удалось показать, что ген красной окраски зерна у пшеницы располагается в 3D-хромосоме (третьей хромосоме генома D), так как у нуллисомика именно по этой хромосоме зерно белое [Майстренко, 1971].

5.7.2. Моносомия

Для картирования гена с использованием моносомиков ставится следующее скрещи-

вание:

$$P \quad A0_A B_R B_R \times AAB_r B_r$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad AAB_R B_r \text{ и } A0_A B_R B_r$$

дикий тип

При локализации мутации в той же хромосоме, по которой взят моносомик (B):

$$P \quad AAB_R 0_B \times AAB_r B_r$$
$$\downarrow$$
$$F_1 \quad AAB_R B_r \text{ и } AAB_r 0_B$$

дикий тип мутант
1 : 1

Результаты первого и второго скрещивания различаются очень четко, и этот метод может быть использован для локализации генов по их рецессивным мутациям.

Литература к разделу 5.7

Майстренко О. И. Создание серии моносомных линий у мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.* и их использование в генетических исследованиях // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов / Под ред. П. М. Жуковского, В. В. Хвостовой. М.: Наука, 1971. С. 57–93.

Тихомирова М. М. Генетический анализ. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 280 с.

5.8. МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

В последнее время для картирования генов широко используют методы клеточной биологии. С 60-х гг. повсеместно используют метод получения гибридных клеток в культуре. Удалось получить гибриды клеток разнообразных животных и растений, известны гибриды соматических клеток человека и животных (мышей, китайского хомячка и др.) и даже млекопитающих и растений. Сначала использовали вирус Сендай, добавление которого в культуру способствует увеличению частоты слияния разных клеток от 0,0001 до 5–10 %. Затем стали применять полиэтиленгликоль, после воздействия которым через 2–5 ч можно наблюдать слившиеся клетки.

После образования соматических гибридов происходит выравнивание митотических циклов, оба ядра делятся одновременно. Но постепенно начинается элиминация хромосом, причем теряются хромосомы одного вида. Так, в гибридных клетках мыши и китайского хомячка в одних условиях могут элиминироваться хромосомы хомячка, а в других — только хромосомы мыши. Просматривая панель — серию клонов клеток, экспериментатор должен отобрать клетки, которые имеют все хромосомы одного вида и только одну хромосому другого, изучаемого вида.

Для получения клеток, используемых в гибридизации, подбирают организмы, у которых биохимические маркеры — ферменты существенно различаются.

Когда в клетке остается только одна хромосома изучаемого вида, определяют активность данного фермента или его электрофоретическую подвижность. Если эти характеристики соответствуют тем, которые были у вида — донора хромосомы, значит, ген, кодирующий данный фермент, картирован в той единственной хромосоме, которая осталась в гибридной клетке от вида-донора.

Очевидно, что этот метод является разновидностью классического генетического анализа. Ограничением его является то, что картировать можно только биохимические признаки.

5.9. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *IN SITU*

Метод гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* был разработан Дж. Голлом (J. Gall) и М. Пардью (M. Pardue) (рис. 5.12) в 1969 г. и стал незаменимым для выявления участка хромосомы, в котором располагается интересующий исследователя фрагмент ДНК.

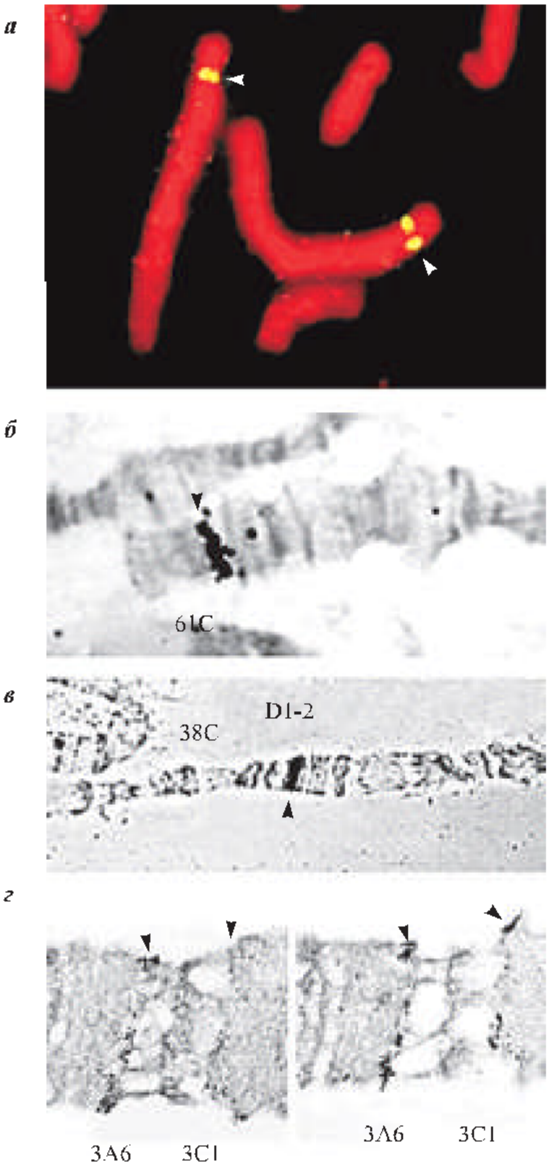
По сведениям Х. Макгрегора, из 32 тыс. работ, опубликованных в мире с 1990 по 2000 г. по хромосомной тематике, в 14,7 тыс. использовали гибридизацию *in situ* [Macgregor, 2000].

Можно экспериментальным путем денатурировать ДНК, входящую в состав хромосом на цитологическом препарате, затем нанести на этот препарат фрагмент меченой ДНК и произвести ренатурацию, в результате чего цепи ДНК вновь сомкнутся из-за комплементационных отношений нуклеотидов. Меченая ДНК в некоторых случаях заменит нативную цепь в том месте молекулы ДНК или хромосомы, которое имеет гомологию с данным фрагментом. Используя этот метод, очень легко можно

Рисунок 5.12

Мэри Лу Пардью
(р. 1930)

Рисунок 5.13



Мечение участков хромосом с помощью метода гибридизации *in situ*:

а — зонд, меченный биотином, конъюгированным с флуоресцеином (желтая окраска), гибридизуется (стрелка) с митотическими хромосомами человека (красная окраска); *б* — ДНК междиска, меченная радиоактивным тритием (^{3}H), гибридизуется с политенными хромосомами дрозофилы (участок гибридизации указан стрелкой); *в* — ДНК, меченная биотином-16-dUTP, гибридизуется с участком политенной хромосомы дрозофилы в районе 38D1–2 (стрелка); *г* — электронно-микроскопическая гибридизация *in situ* ДНК гена *white*, меченной дигоксигенином, с политенными хромосомами дрозофилы. Для выявления сигнала использовали антитела против дигоксигенина, связанные с частицами золота, с последующим усилением сигнала серебром (стрелки).

Фотографии любезно предоставлены А. С. Графодатским, С. А. Демаковым, В. В. Шломой и В. Ф. Семешиным

локализовать любой фрагмент ДНК или ген в том участке хромосомы, где они находятся *in vivo*. Необходимо иметь лишь меченый фрагмент ДНК, называемый зондом. Раньше использовали радиоактивную метку, чаще всего изотоп ^{3}H, сейчас доступны нерадиоактивные метки: биотин, дигоксигенин.

Чтобы получить зонд, меченый нуклеозидтрифосфат вводят в ДНК в реакции с ДНК-полимеразой или фрагментом Клёнова. Затем после гибридизации, в случае ^{3}H, препарат покрывают фотоэмульсией, он экспонируется, радиоактивное излучение восстанавливает кристаллы галоидного серебра в фотоэмульсии. В результате последующего фотопроявления участок гибридизации зонда с хромосомой становится меченным черными точками восстановленного серебра, которое хорошо видно под микроскопом.

Аналогичным образом биотин-UTP включается в ДНК зонда с помощью ДНК-полимеразы или фрагмента Клёнова. Биотин связывается с авидином и ферментом щелочной фосфатазой. Затем в раствор добавляют субстрат, продукты расщепления которого щелочной фосфатазой нерастворимы и имеют красно-коричневый цвет. Таким образом, место связывания зонда в хромосоме будет окрашено. Часто вместо конъюгата авидина и щелочной фосфатазы используют антитела к биотину, меченные

флуоресцентными красками или коллоидным золотом.

Дигоксигенин — это сложное органическое соединение, связывающееся непосредственно с азотистым основанием нуклеотида. Такой измененный нуклеотид вводится в ДНК зонда. Затем на препарат хромосом наносят антитела к дигоксигенину, меченные флуоресцентными красителями. Участок гибридизации зонда флуоресцирует (рис. 5.13).

Литература к разделу 5.9

Macgregor H. C. The future of chromosomes // Chromosomes Today. Switzerland: Birkhauser Verlag, 2000. Vol. 13. P. 305–313.

Manual of Boehringer Mannheim, Biochemica. The DIG system user's guide for filter hybridization, 1993.

Pardue M. L. *In situ* hybridization to DNA of chromosomes and nuclei // *Drosophila* — a practical approach / Ed. D. B. Roberts. Oxford; Washington: IRL Press, 1986. P. 111–137.

5.10. ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Существует система обозначений, пользуясь которой можно схематично изобразить как родственные отношения между членами семьи, так и наличие (отсутствие) у них определенного признака (рис. 5.14).

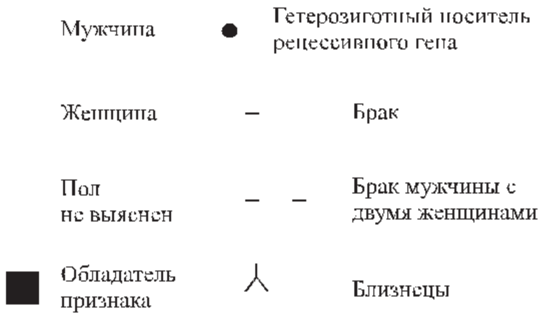
На основании анализа родословных решают, наследуется ли признак, доминантный он или нет.

Аутосомно-доминантное наследование характеризуется тем, что изучаемый признак проявляется в каждом поколении независимо от пола (рис. 5.15, *1*); для аутосомно-рецессивного наследования характерно проявление изучаемого признака у потомков, у родителей которых этот признак может не проявляться (*2*).

Сцепленное с полом рецессивное наследование имеет сходство с рецессивно-аутосомным в том смысле, что для него также характерно появление потомков с признаком, которого не было у родителей. Типичен и так называемый «проскок поколений», т. е. возможность отсутствия потомков с изучаемым признаком в одном из поколений в родословной, а затем его проявление в следующих поколениях (*3*).

Голандрический тип наследования характеризуется передачей признака от отца к сыну (*5*).

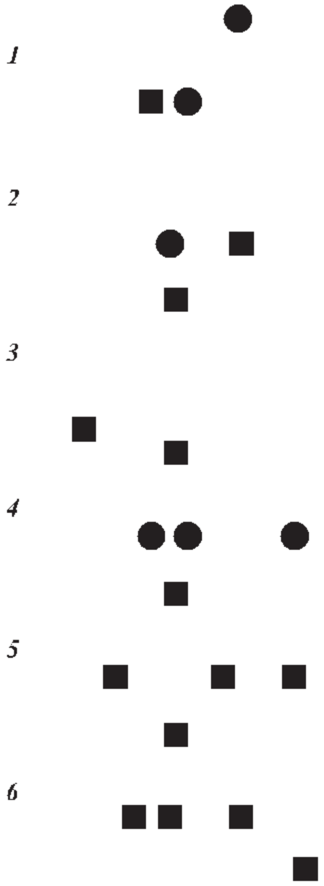
Рисунок 5.14



Система обозначений, используемых при составлении генеалогий

Зависимый от пола аутосомный признак проявляется только у мужчин в последовательных поколениях, в том числе гетерозиготных, но гетерозиготная по этому признаку женщи-

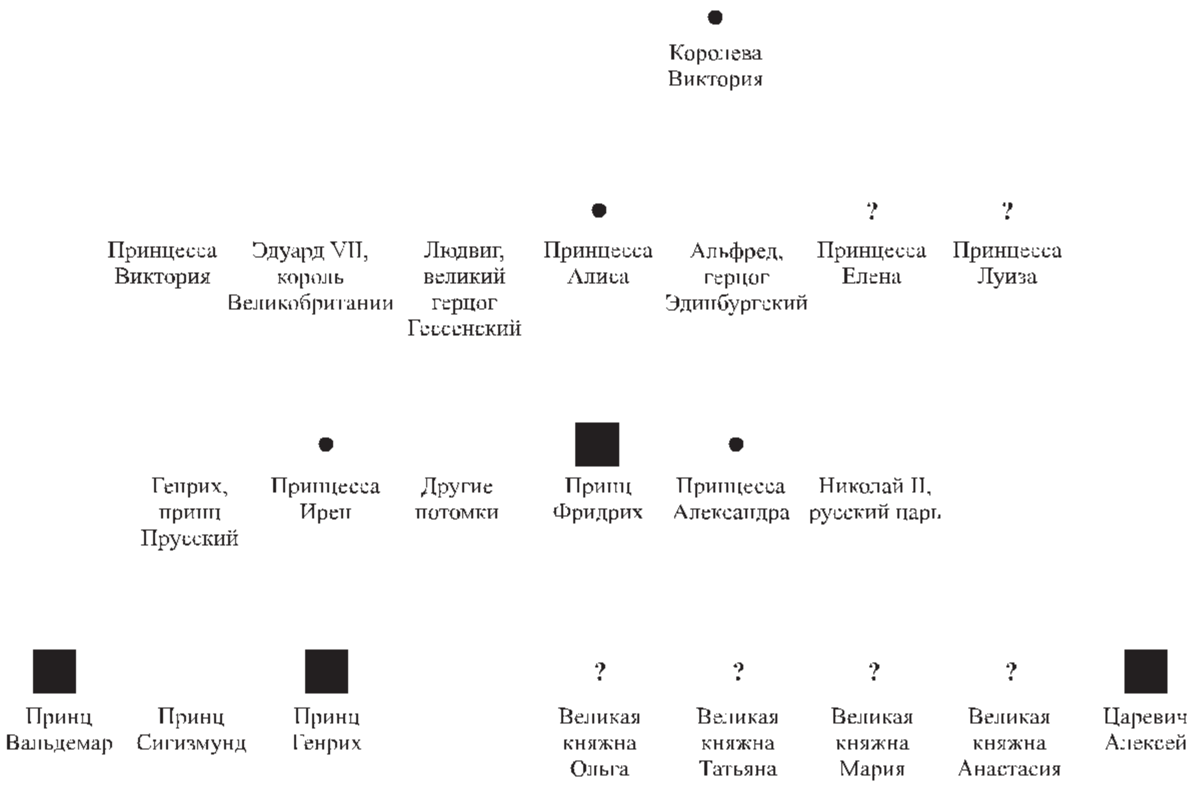
Рисунок 5.15



Родословные, демонстрирующие различные типы наследования признаков у человека [Тихомирова, 1990. С. 55]:

1 — аутосомно-доминантный; *2* — аутосомно-рецессивный; *3* — сцепленный с полом рецессивный; *4* — сцепленный с полом доминантный; *5* — голандрический; *6* — зависимый от пола (аутосомный)

Рисунок 5.16



Часть родословной по наследованию гемофилии в королевских и царских семьях Европы [Айала, Кайгер, 1987. С. 76]

на, у которой он не проявляется, может передать его сыну (*б*).

На рис. 5.16 показана родословная по передаче гемофилии в королевских и царских семьях Европы.

Литература к разделу 5.10

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3 т. Т. 1. М.:, Мир, 1988. С. 76.

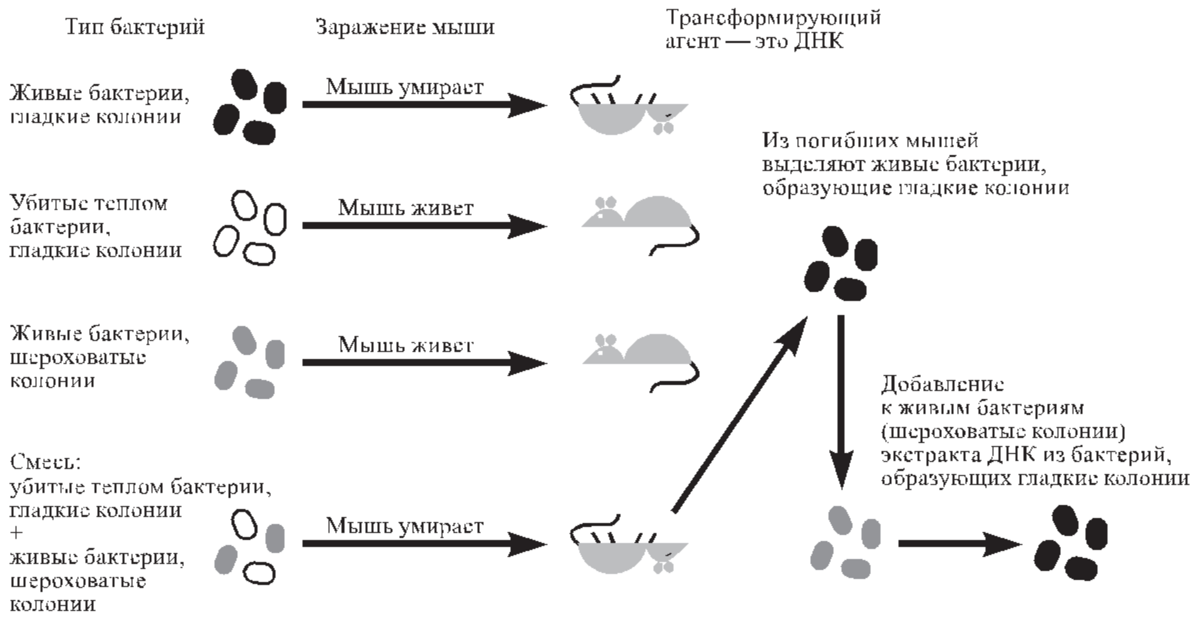
Тихомирова М. М. Генетический анализ. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. С. 54–60.

5.11. ТРАНСФОРМАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

Трансформация — это перенос генетического материала от одного организма к другому. Посредством генетической рекомбинации часть трансформирующей молекулы ДНК может обмениваться с частью хромосомной ДНК донора. Трансформацию используют также в экспериментах для определения порядка генов, расстояний между ними в молекуле ДНК и построения генетических карт.

Известно, что бактерия *Pneumococcus pneumoniae* имеет несколько форм. Вирулентность ее определяется наличием мукополисахаридной капсулы на поверхности клетки, которая защищает бактерию от воздействий со стороны организма-хозяина. В результате размножившиеся бактерии убивают зараженное животное. Бактерии этого штамма (S-штамм) образуют гладкие колонии. Авирулентные формы не имеют защитной капсулы и образуют шероховатые колонии (R-штамм). Микробиолог Ф. Гриффитс в 1928 г. инъецировал мышам культуру живого пневмококка R-штамма вместе с S-штаммом, убитым высокой температурой (65 °С) (рис. 5.17). Спустя некоторое время ему удалось выделить из зараженных мышей живые пневмококки, обладающие капсулой. Таким образом, оказалось, что свойство убитого пневмококка — способность образовывать капсулу — перешло к живой бактерии, т. е. произошла трансформация этих клеток. От этого превращения клеток и возник сам термин «трансформация». Поскольку признак наличия

Рисунок 5.17



Трансформация у бактерий *Pneumococcus*

капсулы является наследственным, то следовало предположить, что какая-то часть наследственного вещества от бактерий штамма S перешла к клеткам штамма R.

В 1944 г. О. Эйвери, К. МакЛеод и М. МакКарти (O. Avery, C. McLeod, M. McCarty) показали, что такое же превращение типов пневмококков может происходить в пробирке, т. е. *in vitro*. Эти исследователи установили существование особой субстанции — «трансформирующего принципа» — экстракта из клеток штамма S, обогащенного ДНК. Как далее выяснилось, ДНК, выделенная из клеток S-штамма и добавленная в культуру R-штамма, трансформировала часть клеток в S-форму. Клетки стойко передавали это свойство при дальнейшем размножении. Обработка трансформирующего фактора ДНК-азой — ферментом, разрушающим ДНК, блокировала трансформацию.

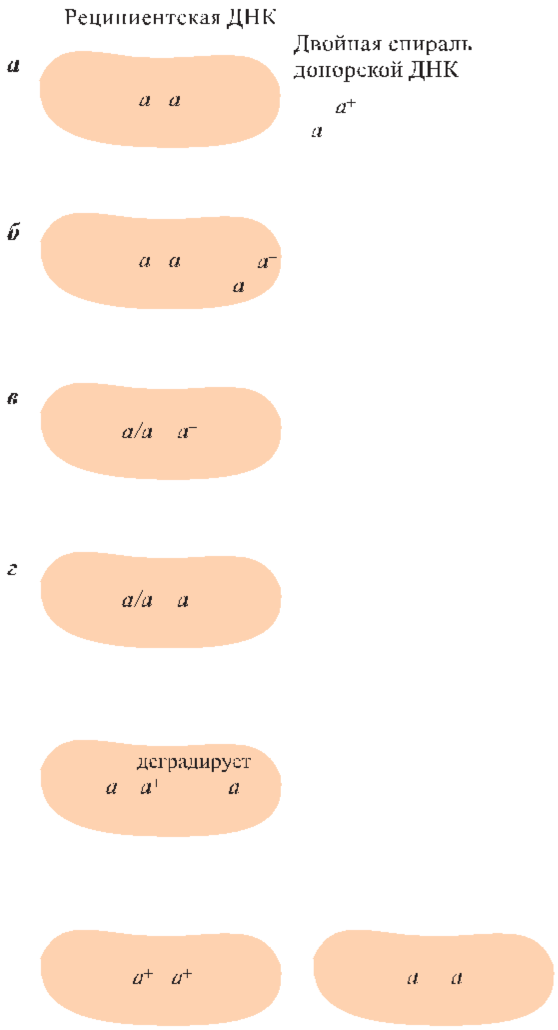
Эти данные впервые показали, что именно ДНК, а не белок, как полагали до тех пор, является наследственным материалом.

Известны два типа бактериальной трансформации: естественная, например у *Bacillus subtilis*, и индуцированная, которая связана с тем, что бактериальная клетка специально готовится к процессу переноса ДНК, т. е. она приобретает компетентность к трансформации.

Компетентные клетки несут на поверхности новый антиген, называемый фактором компетентности. При добавлении факторов компетентности в культуру бактериальных клеток изменяются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана. Стенка становится более пористой. Дополнительные впячивания мембраны внутрь клеток обеспечивают приближение присоединенного к ней нуклеоида к клеточной поверхности, что облегчает взаимодействие между донорной и реципиентной ДНК. Условиями, существенными для присоединения ДНК к компетентным клеткам, являются ее размеры (молекулярная масса не менее 3×10^5) и интактность двухцепочечной структуры. По этим причинам ДНК, разрушенная ДНК-азой, не обладает трансформирующей активностью. Увеличить компетентность можно обработкой некоторыми химическими агентами или воздействием сильным электрическим полем (электропорация).

В ходе трансформации одна из двух цепей ДНК деградирует и в клетку проникает другая, которая спаривается с гомологичным участком ДНК в реципиентной клетке, с цепью, являющейся комплементарной ей (рис. 5.18, *а–в*). Затем в результате двойного кроссинговера между однонитчатой донорной ДНК и двунитчатой ДНК реципиента происходит образование рекомбинантной хромосомы реципиента. При этом в участке ДНК, ограниченном сайтами кроссинговера, одна нить ДНК имеет реципиентный сегмент *a*, вторая — донорный a^+ (см. рис. 5.18, *г*). Такие районы ДНК с различающимися последовательностями нуклеотидов в двух нитях называют гетеродуплек-

Рисунок 5.18



Процесс естественной трансформации у *Bacillus subtilis*:

а — линейная донорская двухцепочечная молекула ДНК, которая несет a^+ аллель какого-то гена, реципиентская бактерия имеет аллель *a*; *б* — одна нить донорской ДНК проникает в клетку-реципиент; *в* — одиночная цепь донорской ДНК спаривается с гомологичным районом хромосомы реципиента, формируя трехнитчатую структуру; *г* — двойной кроссинговер продуцирует рекомбинантную a^+/a молекулу ДНК (гетеродуплекс) и линейный фрагмент *a*, последний деградирует. По завершении репликации половина потомков являются a^+-трансформантами, другая половина имеет родительский генотип *a*

сами. Уже после первого раунда репликации ДНК образуются два типа клеток: исходные и трансформированные, которые несут ДНК донора. Первые стадии трансформации — присоединение ДНК к клеточной оболочке, ее поглощение и деградация одной цепи — осуществляются с равной эффективностью независимо от ее гомологии с ДНК реципиента. Однако процесс рекомбинации специфичен в отношении гомологичной ДНК и с негомологичной происходит с очень низкой частотой. Минимальная длина цепочки ДНК, способной интегрироваться в реципиентскую хромосому, составляет около 500 пн (пар нуклеотидов). Однако обычно в рекомбинации участвуют фрагменты донорной ДНК длиной около 200 тпн (тысяч пар нуклеотидов), или около 1/200 всей бактериальной хромосомы.

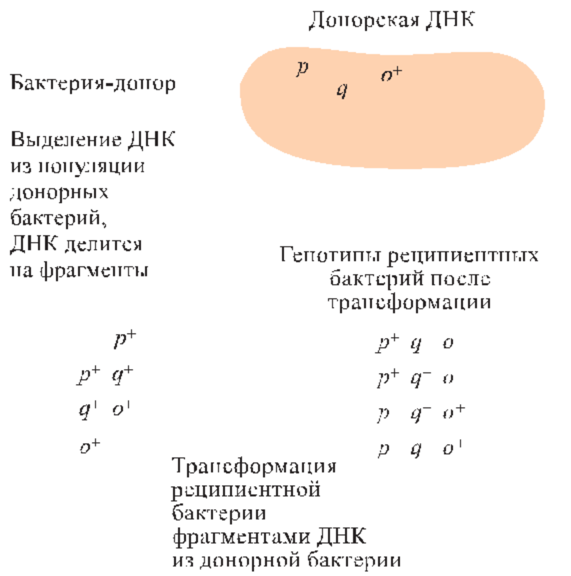
Частота трансформации по хромосомным маркерам зависит от свойств данного препарата ДНК, ее концентрации, состояния клетки реципиента, вида бактерий. У пневмококков при селекции по одиночному маркеру частота трансформации составляет 10^{-2}–10^{-3} на одну клетку реципиента. У гемофильных бактерий частота трансформации варьирует от 10^{-3} до 10^{-7}. Трансформация, хотя и с очень низкой частотой, может происходить даже между разными видами бактерий, что помогает установить степень родства между ними.

ДНК, освобождающаяся в окружающую среду при лизисе стареющих культур бактерий, в природных условиях обладает трансформирующей активностью. Это значит, что трансформация является одним из природных способов обмена генетическим материалом у бактерий.

Трансформация используется также для генетического картирования у бактерий. Как уже отмечалось, при трансформации в хромосому реципиента встраивается сравнительно небольшой фрагмент ДНК. Если два гена находятся в хромосоме на значительном расстоянии друг от друга, они не могут локализоваться в одном и том же фрагменте трансформирующей ДНК. Одновременная трансформация (котрансформация) двумя независимыми фрагментами, содержащими эти гены, — событие крайне маловероятное. Таким образом, частота котрансформации двух генетических маркеров служит показателем расстояния между ними (рис. 5.19).

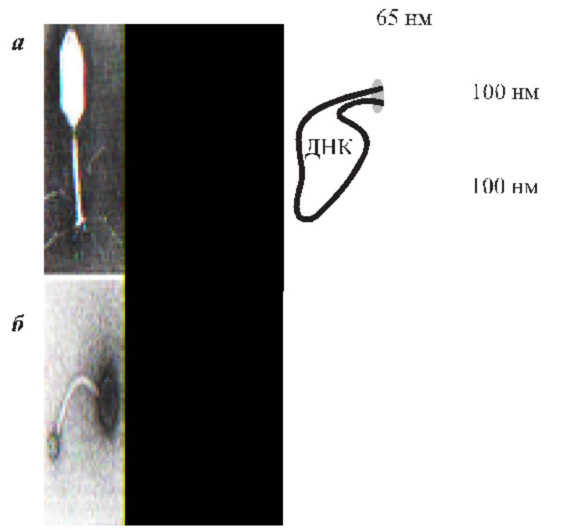
Например, если гены *p* и *q* часто передаются реципиенту вместе, то они и в хромосоме расположены рядом. Аналогично оценивается степень близости генов *q* и *o*. Чтобы определить порядок этих трех генов, нужно знать, как передаются гены *p* и *o*. Теоретически возможны два варианта: *p–o–q* и *p–q–o*. Если гены расположены в соответствии с первой последовательностью, *p* и *o* должны котрансформироваться чаще, чем *p* и *q*. Однако результаты опыта (см. рис. 5.19) свидетельствуют об отсутствии котрансформации *p* и *o*, что прямо указывает на то, что гены расположены в порядке *p–q–o*.

Рисунок 5.19



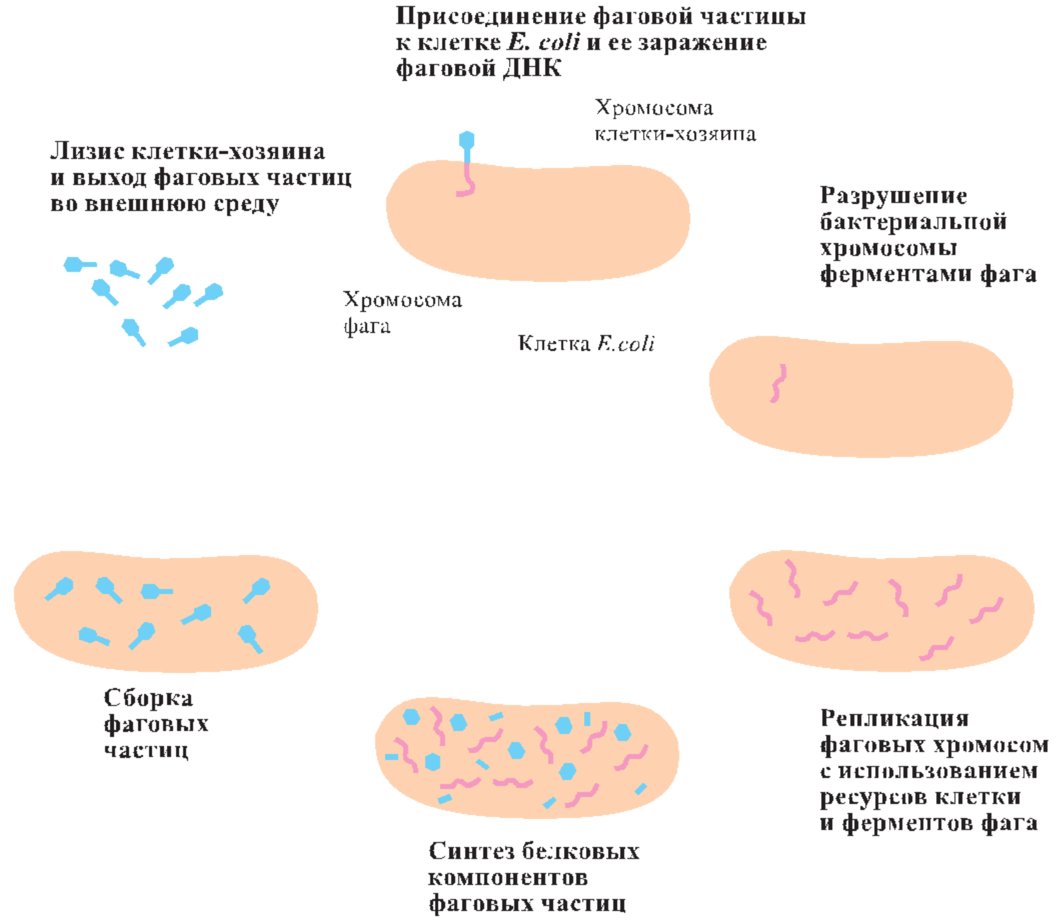
Определение порядка генов при котрансформации (объяснения в тексте) [Russell, 1998. P. 229]

Рисунок 5.20



Электронно-микроскопические фотографии и схемы строения бактериофагов T4 (*а*) и λ (*б*) [Russell, 1998. P. 238]

Рисунок 5.21



Жизненный цикл вирулентного фага, например T2 или T4 [Russell, 1998. P. 239]

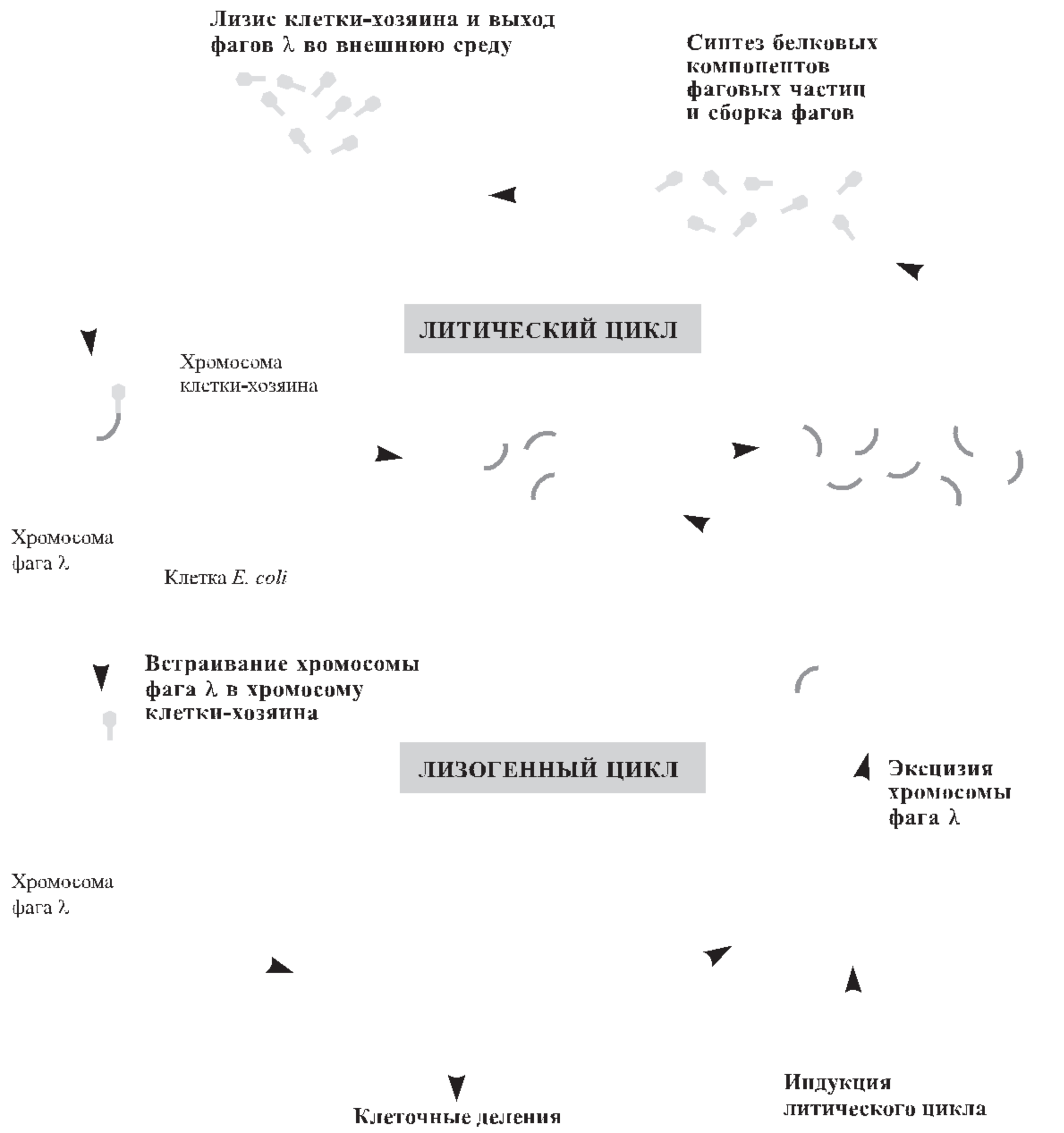
5.12. ТРАНСДУКЦИЯ

Трансдукцией называется перенос ДНК из одной клетки (донор) в другую (реципиент) с помощью бактериофагов (рис. 5.20–5.22). Этот способ генетического обмена был открыт в 1952 г. Н. Зиндером и Дж. Ледербергом (N. Zinder, J. Lederberg) у *Salmonella typhimurium*.

Различают три типа трансдукции: общую (неспецифическую), ограниченную (специфическую) и абортивную.

Общая трансдукция. В экспериментах U-образная трубка в нижней части была разделена посередине бактериальным фильтром. В одну половину этой трубки были помещены тифозные бактерии штамма 22A, а в другую половину — штамма 2A (рис. 5.23). При этом бактериальные клетки не могли переходить через фильтр. Штамм 22A нес мутацию, блокирующую синтез триптофана (*T*), штамм 2A —

Рисунок 5.22



Жизненный цикл умеренного фага, например λ [Russell, 1998. P. 240]

Когда такой фаг инфицирует клетку, развитие может пойти по литическому или лизогенному пути

Рисунок 5.23

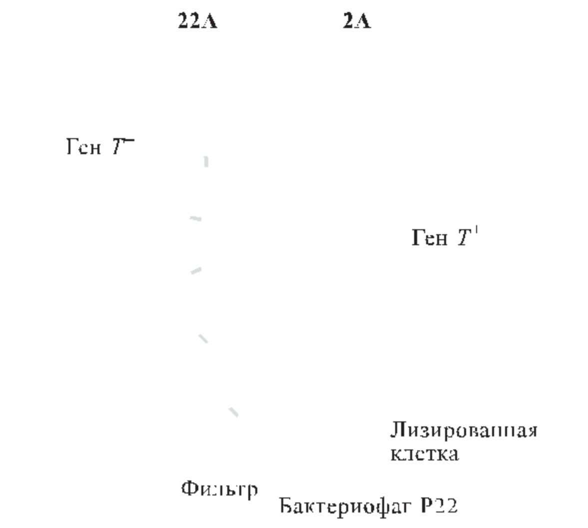


Схема опыта, демонстрирующего явление трансдукции у *Salmonella typhimurium*: 22А — штамм бактерий, не способных синтезировать триптофан (*T*); 2А — штамм бактерий, не способных синтезировать гистидин (*H*)

блокирующую синтез гистидина (*H*). После инкубации этих двух разных штаммов в трубке, разделенной фильтром, был произведен рассев клеток обоих штаммов.

При рассеве клеток штамма 22А на среде без триптофана было обнаружено небольшое число колоний. Следовательно, некоторые клетки приобрели способность синтезировать триптофан и смогли дать колонии на среде без этой аминокислоты. Фильтрующимся агентом, переносящим ген T^+ от штамма 2А к штамму 22А, оказался бактериофаг. В случае общей трансдукции фрагменты бактериальной донорной ДНК случайно включаются в созревающую частицу вместе с фаговой ДНК или даже вместо нее (рис. 5.24).

При этом бактерия-донор через фаг передает реципиенту лишь отдельный фрагмент ДНК длиной 1/50–1/100 от всей бактериальной хромосомы. Обнаружение котрансдуцируемости двух или более генетических маркеров указывает на их сцепленность, а по частоте такой котрансдукции можно судить о порядке расположения маркеров на генетической карте. Например, если маркеры a^+ и b^+, а также b^+ и c^+ котрансдуцируются попарно, а a^+ и c^+ не котрансдуцируются, следовательно, они локализуются в порядке *a–b–c*.

Величина трансдуцируемого фрагмента определяется размером ДНК донора, способной упаковаться в головку фага. Доказано, что в частицах трансдуцирующего фага практически вся фаговая ДНК может быть заменена на бактериальную. Поскольку ДНК фага P1 состоит примерно из 10^2 тпн, а хромосома *E. coli* — примерно из 4×10^3 тпн, то фрагмент хромосомной ДНК, способный включиться в трансдуцирующую частицу, составляет около 2,3 % хромосомы *E. coli*. Если исходить из того, что длина среднего гена равна 1 тпн, то при трансдукции фагом P1 возможен совместный перенос около 100 генов, а, например, фагом P22 — около 40 генов.

Ограниченная трансдукция. При ограниченной трансдукции происходит рекомбинация между фаговой и хромосомной бактериальной ДНК, поэтому фаговые трансдуцирующие частицы обязательно содержат ДНК обоих типов.

Абортивная трансдукция. Трансдуцируемый фагом фрагмент ДНК донора не включается в хромосому клетки-реципиента, а остается в ее цитоплазме и в таком виде способен поддерживаться и проявляться фенотипически.

5.13. КОНЪЮГАЦИЯ

Конъюгацией у бактерий называют однонаправленную передачу генетической информации в результате непосредственного контакта между донорной и реципиентской клетками, т. е. фактически полового процесса. Наличие полового процесса у бактерий было доказано следующим образом: у *E. coli* был получен ряд биохимических мутантов с потребностями в биотине (*B*), метионине (*M*), пролине (*P*), треонине (*T*). Все эти штаммы не росли на минимальной среде.

В опытах Дж. Ледерберга и Э. Тейтума (1946 г.) были взяты два штамма, различающиеся по генотипу: $B\ M\ P^+T^+$ и $B^+M^+P\ T$. Клетки обоих ауксотрофных штаммов в течение некоторого времени выращивали в смешанной культуре, а затем высевали на минимальную среду. Ни один из двух исходных штаммов не мог расти на этой среде. Однако на каждые 10^9 посеянных клеток из смешанной культуры на минимальной среде выраста-

Дополнение 5.2

В 1958 г. за открытие генетической рекомбинации и организации генетического материала у бактерий Дж. Ледербергу (J. Lederberg) была присуждена Нобелевская премия.

Рисунок 5.24

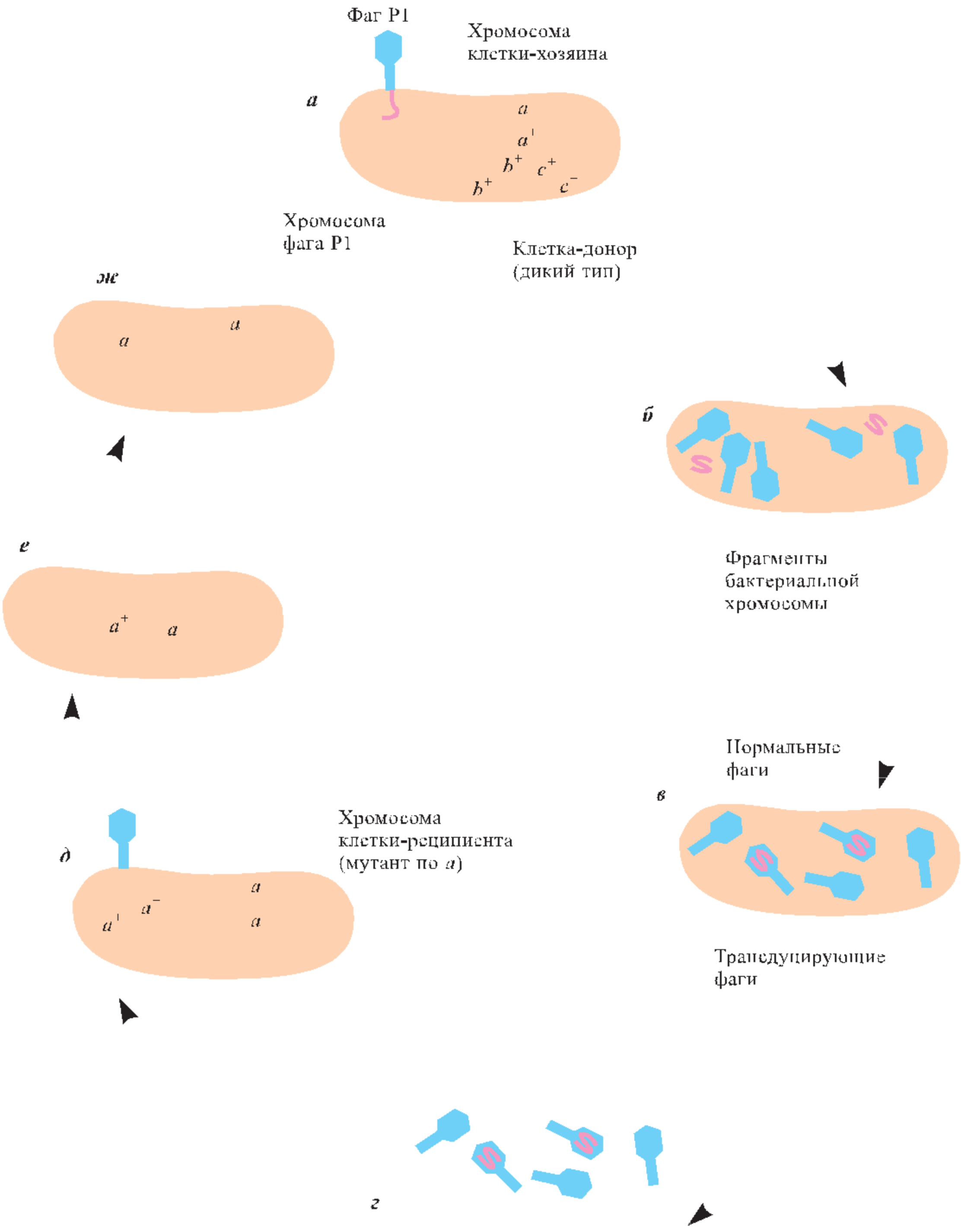
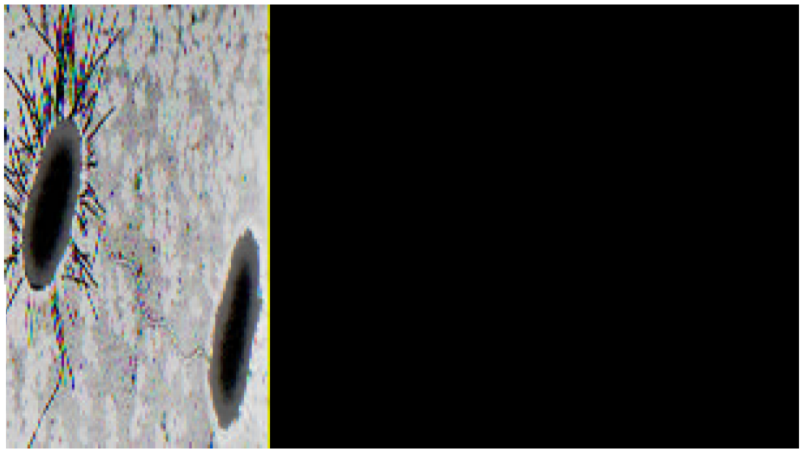


Схема общей трансдукции между линиями *E.coli*:

а — клетка дикого типа, инфицированная фагом P1; *б* — ДНК клетки-хозяина деградирует в ходе литического цикла; *в* — в ходе сборки фаговых частиц некоторые фрагменты бактериальной хромосомы включены в некоторые фаги-потомки, что потом приведет к трансдукции; *г* — лизис; *д* — трансдуцирующий фаг инфицирует ауксотрофную бактерию-реципиент; *е* — двойной кроссинговер приводит к обменам донорного гена a^+ и реципиентного гена *a*; *ж* — образование стабильного трансдуктанта a^+

Рисунок 5.25



Конъюгация у *E. coli.* Электронная микрофотография F^+ клетки (слева), связанной с F^- клеткой (справа) половой ворсинкой — F-пилем [Russell, 1998. P. 224]

ло около 100 колоний. По генотипу эти клетки могли быть только $B^+M^+P^+T^+$.

Чтобы установить, нужен ли для процесса передачи информации физический контакт клеток, Б. Дэйвис (B. Davis) поместил оба штамма в U-образную трубку, плечи которой были разделены бактериальным фильтром. После нескольких часов инкубации он высеял клетки на минимальную среду. Колонии на ней не выросли. Отсюда следовал вывод о том, что для появления рекомбинантов необходим непосредственный контакт между бактериальными клетками. Это заключение было сделано на основе чисто генетических экспериментов. Позднее с помощью электронной микроскопии были получены фотографии конъюгирующих бактерий, соединенных друг с другом тонким мостиком-пилем (рис. 5.25). Эти данные свидетельствовали о том, что *E.coli* имеет определенный тип скрещивания, называемый конъюгацией, когда генетический материал может передаваться между клетками, временно находящимися в контакте.

В 1953 г. У. Хэйес (W. Hayes) установил, что обмен информацией у бактерий происходит только в одном направлении.

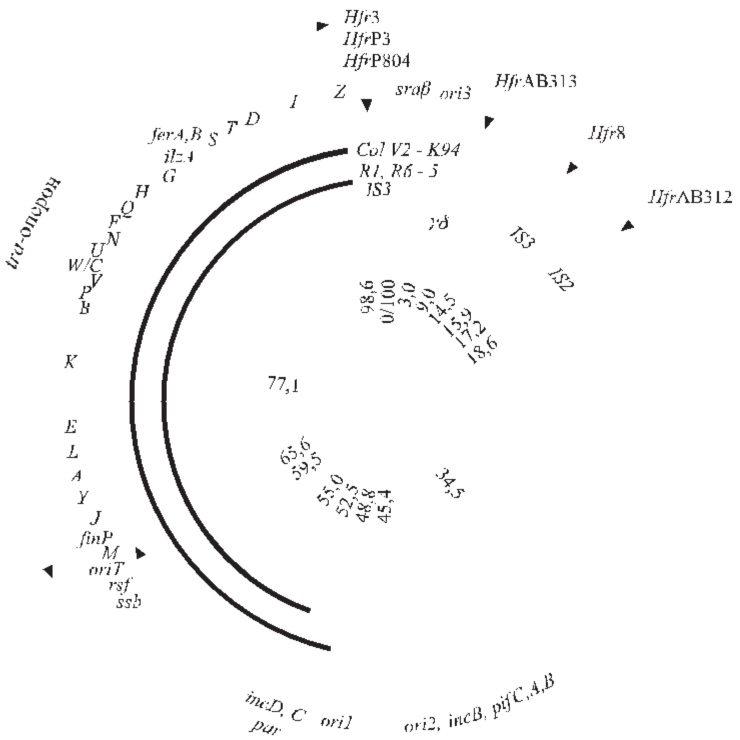
Исследованные штаммы первоначально распались на две группы. В первой группе конъюгации клеток не было. Во второй группе она происходила, но число рекомбинантов было небольшим. Представители разных групп вступали в конъюгацию друг с другом в 100–1000 раз чаще. Их стали рассматривать в качестве разных половых типов — F и F^+ (F — значит fertility). Скрещивания бактерий штаммов $F \times F$ всегда безуспешны, а $F^+ \times F^+$ лишь изредка дают рекомбинацию. Поведение бактерий этих типов функционально различно. В потомстве F^+ никогда не получаются рекомбинанты, в то же время от клеток F получаются рекомбинанты, совмещающие признаки обоих родителей. Таким образом, при конъюгации клеток происходит односторонняя передача генетического материала от клетки F^+ в клетку F^-. Клетки F^- после конъюгации приобретают характеристики F^+.

Позже был выявлен и третий половой тип, определяющий высокую частоту рекомбинации — *Hfr* (high frequency recombination). Клетки этого типа возникают в культурах F^+. Скрещивания $F^- \times Hfr$ дают особенно высокую частоту рекомбинантов — 1 на 10 исходных клеток (в скрещиваниях $F^- \times F^+$ — 1 на 10^4 исходных клеток).

В скрещиваниях $F^- \times F^+$ установлено, что фактор фертильности (F-фактор) передается с высокой частотой независимо (автономно) от остальных генов. Клетки *Hfr* теряют способность к автономной передаче F-фактора. Генетический анализ показал, что в линии *Hfr* он передается сцепленно с другими генами и занимает определенный локус в бактериальной хромосоме. Таким образом, F-фактор, если он присутствует в клетке, ведет себя двояко: как автономная цитоплазматическая частица (в клетках F^+) или как локус хромосомы (в клетках *Hfr*). В F^- клетках он отсутствует.

F-фактор несет гены, контролирующие образование пилей и способность к переносу в другие бактерии. Позднее F-фактор стали называть плазмидой — кольцевой молекулой ДНК, реплицирующейся в клетке автономно от хромосом и содержащей некоторое число генов.

Рисунок 5.26



Генетическая карта плазмиды *F* [Алиханян и др., 1985. С. 296].

На внутренней окружности отмечены некоторые координаты, на следующей — расположение *IS*- и *TN*-элементов; жирными линиями указаны районы гомологии плазмиды *F* с плазмидами группы *Inc FI* и *Inc FII*. На внешней окружности показано расположение генов *tra*-оперона и ряда других генов, контролирующих различные функции плазмиды. Локусы *ori1–3* — точки начала вегетативной репликации плазмидной ДНК. Стрелками указаны места интеграции плазмиды в бактериальную хромосому, ведущей к образованию *Hfr*-штаммов

F-фактор и другие плазмиды, способные находиться в клетке в свободном состоянии либо интегрироваться с ее хромосомой, называют также эписомами.

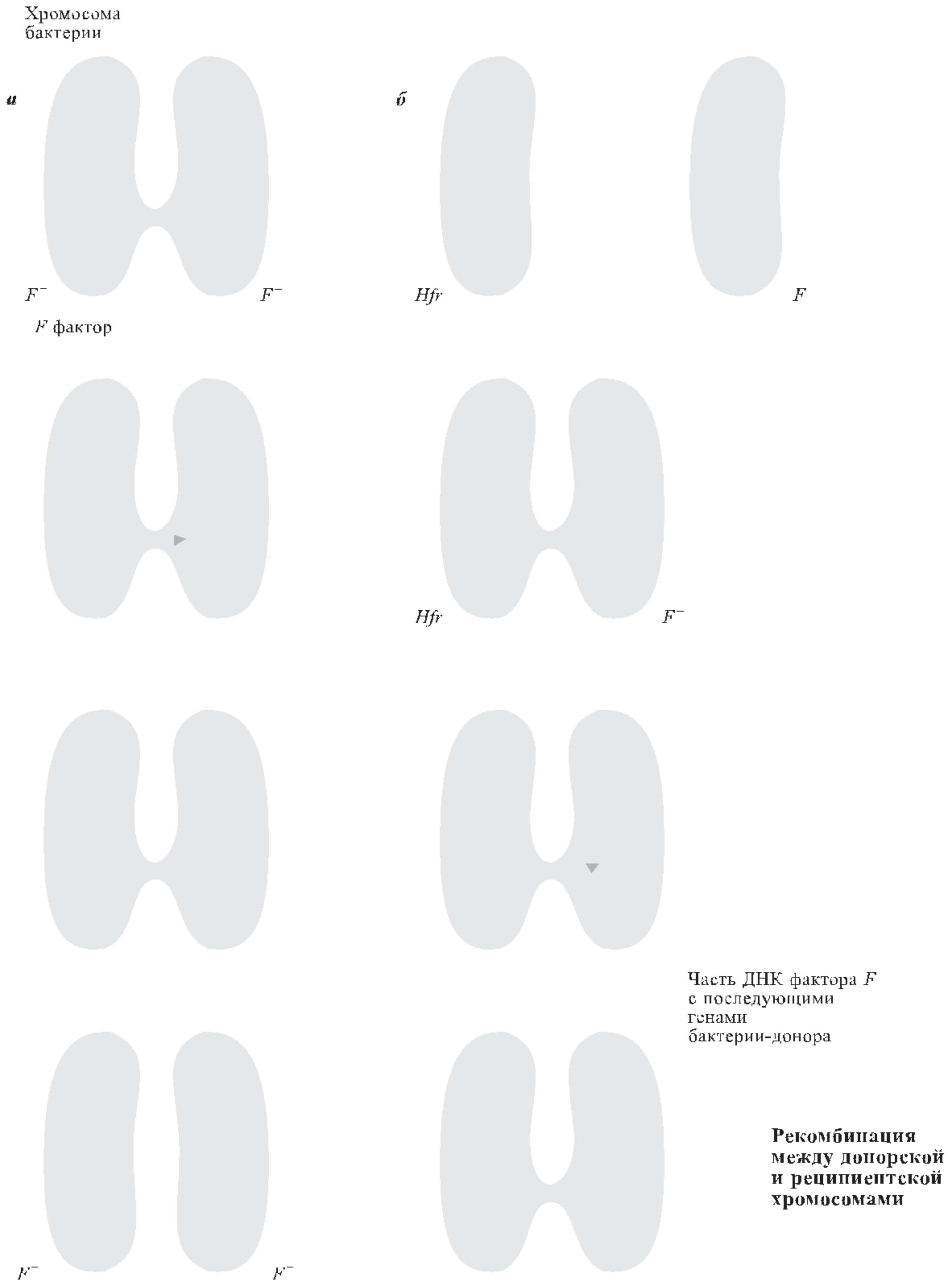
F-фактор — это крупная плазмида. Длина ее ДНК составляет около 100 тпн (рис. 5.26). В ней идентифицировано около 20 генов, контролирующих различные этапы конъюгации. Большая часть этих генов образует единый оперон *traY–Z* (*tra* — transfer — перенос) длиной около 30 тпн.

F^--штамм *E. coli* не несет *F*-фактора, но может принимать его от донора. Такие штаммы называют реципиентными или женскими. В мужской клетке *F*-фактор может находиться в двух альтернативных состояниях: в автономном, когда он реплицируется независимо от хромосомы (F^+-штамм), и в интегрированном, когда он присоединяется к хромосомной ДНК и реплицируется в ее составе (рис. 5.27). Частота интегрирования *F*-фактора в хромосому штамма-хозяина составляет 1 на 10^6 клеток F^+.

Образование *Hfr*-клеток происходит в результате кроссинговера между кольцевыми ДНК хромосомы и *F*-фактора. В хромосоме *E. coli* более 20 сайтов, в которых может происходить интеграция плазмиды *F* (см. рис. 5.26). В ее основе лежит сайт-специфическая рекомбинация, опосредованная особыми последовательностями ДНК — *IS*-элементами (см. разд. 6.7).

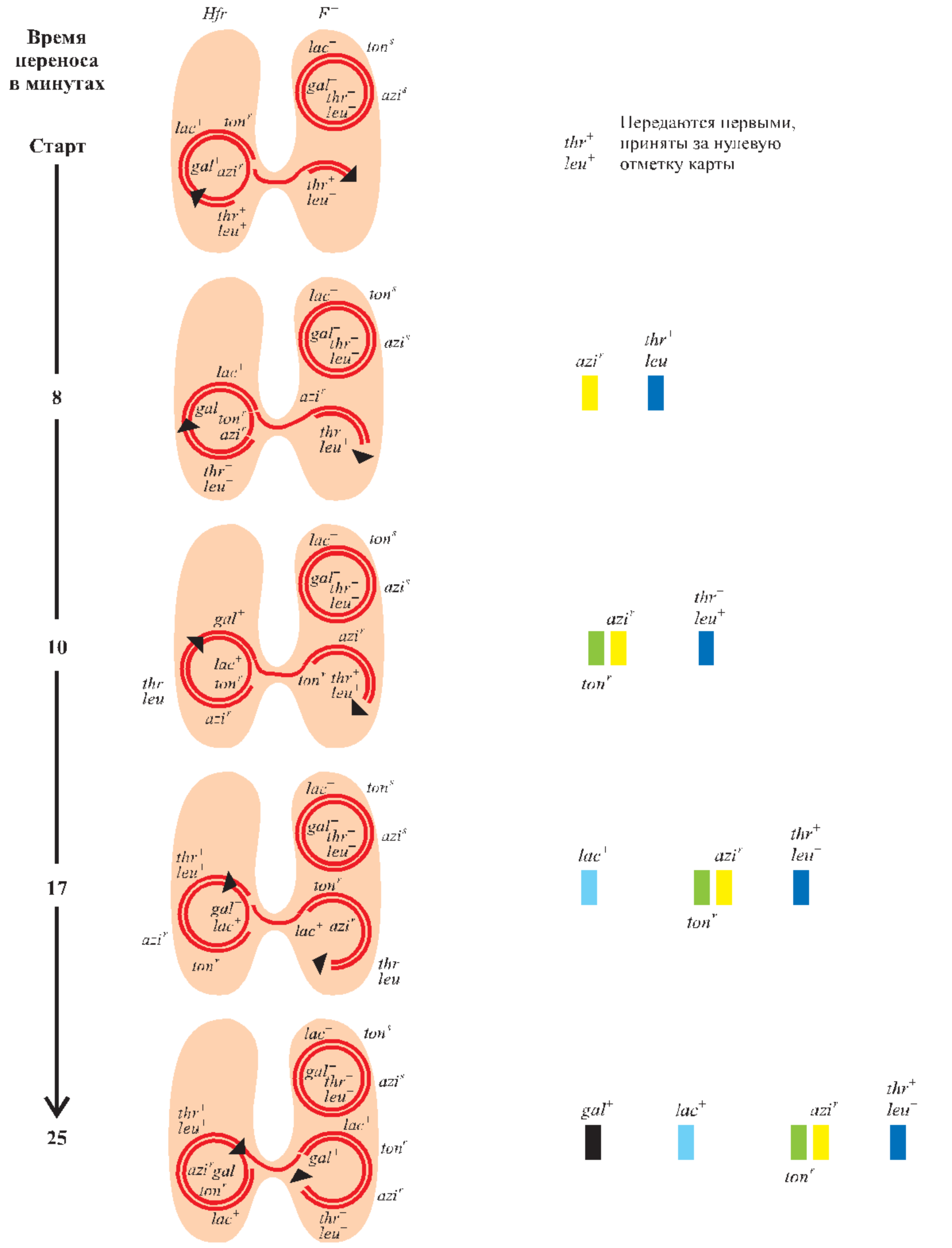
Начало конъюгационного переноса связано с разрезанием одной из нитей ДНК плазмиды *F* в локусе *oriT*, расположенном перед генами *tra*-оперона и ориентированном таким образом, что *tra*-область переносится в реципиентную клетку последней. Этот надрез осуществляется сайт-специфичной эндонуклеазой, кодируемой генами *traY* и *traZ*. Раскручивание дуплекса ДНК происходит под действием фермента ДНК-геликазы, кодируемой плазмидным геном *traI*. Фермент движется по молекуле ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу и раскручивает ее со скоростью около 1200 пн в 1 с. Освободившийся в результате надрезания и раскручивания 5'-конец одной из цепей ДНК переносится через конъюгационную пору в клетку реципиента. Одновременно эта ДНК реплицируется.

Рисунок 5.27



Передача генетического материала в результате конъюгации у *E. coli* [Russell, 1998. P. 232]:
а — передача *F*-фактора от донора к реципиенту в скрещивании $F^- \times F^+$; *б* — образование линии *Hfr* в результате интеграции F^- фактора и передачи бактериальных генов от донорных к реципиентным клеткам в ходе скрещивания $F^- \times Hfr$

Рисунок 5.28

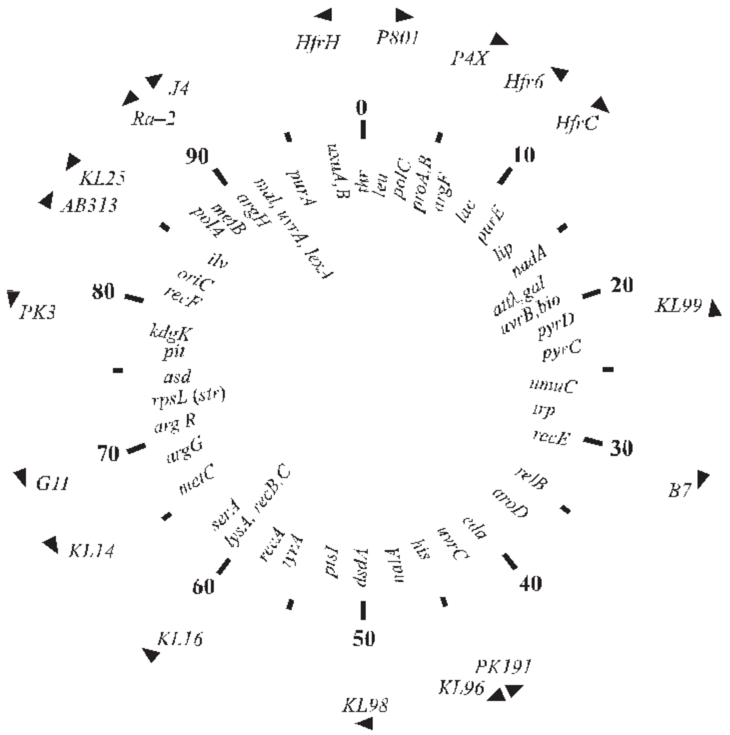


Картирование генов в геноме *E. coli* в результате скрещивания

HfrH thr⁺ leu⁺ aziʳ tonʳ lac⁺ gal⁺ strˢ × *F⁻ thr leu aziˢ tonˢ lac gal strʳ* [Russell, 1998. P. 235].

Рекомбинанты получаются за счет обмена донорного фрагмента и гомологичного фрагмента реципиента в результате двойного кроссинговера. Через различные промежутки времени после начала скрещивания конъюгирующие пары разделяют и высевают на селективную среду, чтобы определить, какие гены перенесены из *Hfr* в *F*

Рисунок 5.29



Неполная карта кольцевой хромосомы *E. coli* штамма K12 [Алиханян и др., 1985. С. 301]

Процесс конъюгации можно использовать для генетического картирования (рис. 5.28). Генетический материал переносится от донора к реципиенту однонаправленно в строгой последовательности. Если резко (в специальном аппарате-блэндере) встряхнуть культуры клеток, вступивших в конъюгацию, то они разъединяются. В зависимости от продолжительности конъюгации до встряхивания в F^- клетку будет перенесена большая или меньшая часть хромосомы *Hfr*.

За 1 мин передается примерно 40 тпн, т. е. около 1% бактериальной хромосомы, и, следовательно, на перенос всей хромосомы *E. coli* потребовалось бы около 100 мин.

На рис. 5.29 показано расположение некоторых генов у *E. coli*. За точку отсчета принято начало переноса маркера thr^+ в скрещиваниях F^- × *HfrH*. Единицей карты служит минута, т. е. количество ДНК, передаваемое *Hfr*-клеткой за 1 мин. Цифрами над внутренним кругом обозначен масштаб карты в минутах относительно точки 0, в которой расположены три гена, образующие оперон биосинтеза треонина. Всего на карте показано расположение около 50 генов. На внешнем круге стрелками обозначены начало и направление переноса хромосомы различными *Hfr*-штаммами.

На карту *E. coli* K12 с помощью конъюгации и трансдукции нанесено более 1000 генов, что составляет около 30 % ее генетической емкости [Алиханян и др., 1985].

Литература к разделам 5.11–5.13

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 261–327.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 198–224.

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 416–453.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 224–266.

Глава 6
СТРУКТУРА И ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА

6.1. РОЛЬ ДНК В НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

По-видимому, самую первую гипотезу о физико-химической природе генов и хромосом предложил Н. К. Кольцов в 1927, а в более развернутой форме — в 1935 г. (дополнение 6.1).

Как уже упоминалось в разд. 5.11, в результате изучения явления трансформации у бактерий было впервые показано, что именно ДНК может служить генетическим материалом. Несколько позднее были получены новые доказательства этого в экспериментах другого типа. Как известно, фаг T2 является вирусом, инфицирующим бактерию *E. coli*. Фаговые частицы адсорбируются на наружной поверхности клетки, их материал проникает внутрь и примерно через 20 мин бактерия лизируется, освобождая большое число фаговых частиц — потомков. В 1952 г. А. Херши и М. Чейз инфицировали бактерий фагами T2, которые были мечены радиоактивными соединениями: ДНК — с помощью ^{32}P, белковая часть фага — ^{35}S (рис. 6.1). После инфекции бактерий фагами с помощью центрифугирования удалось выделить две фракции: пустые белковые оболочки фага и бактерии, инфицированные фаговой ДНК. Оказалось, что 80 % метки ^{35}S осталось в пустых фаговых оболочках, а 70 % метки ^{32}P — в инфицированных бактериях. Фаги-потомки получили только около 1 % исходного белка, меченного ^{35}S, однако в них же обнаружилось около 30 % метки ^{32}P.

Дополнение 6.1

Н. К. Кольцов предположил, что хромосомы представляют собой огромные молекулы белков или пучки таких молекул. О существовании в клетках других длинных молекул, состоящих из гетерогенных мономеров, тогда еще не знали. ДНК, или, как ее тогда называли, тимонуклеиновая кислота, считалась, как пишет Э. Шрёдингер в своей знаменитой книге «Что такое жизнь с точки зрения физика?», «сравнительно простым органическим соединением, которому было бы странно приписывать роль носителя наследственных свойств». Вот что пишет сам Н. К. Кольцов о формировании хромосом (генонем) и генов: «Первоначально, когда у простейших организмов впервые слагались генонемные молекулы, они были представлены однообразными более или менее длинными цепями из одинаковых звеньев, вроде кератина или серицина. Каждое звено состояло из немногих простых радикалов. При дальнейшей эволюции организма эти молекулы постепенно усложнялись путем присоединения к некоторым звеньям боковых радикалов, получающих значение генов. Мало-помалу число этих боковых цепей, размещенных в определенных пунктах генонемы, увеличивалось и самые радикалы все более усложнялись. Микроскопическая картина хромосом в слюнных железах дрозофилы представляет картину уже очень высокой дифференцировки генонем. Если признать, что поперечные диски соответствуют генам, то здесь мы должны поместить именно боковые радикалы или цепи радикалов, которые адсорбируют ярко окрашенный хроматин. В таком случае неокрашиваемые сегменты, в которых мы различаем продольные нити, придется признать основными цепями, не осложненными сложными боковыми придатками. Но при дальнейшей дифференцировке и сюда могут присоединяться боковые радикалы — новые гены, а, с другой стороны, уже имеющиеся боковые радикалы могут осложняться и упрощаться в мутационном процессе» [Кольцов, 1935. С. 119].

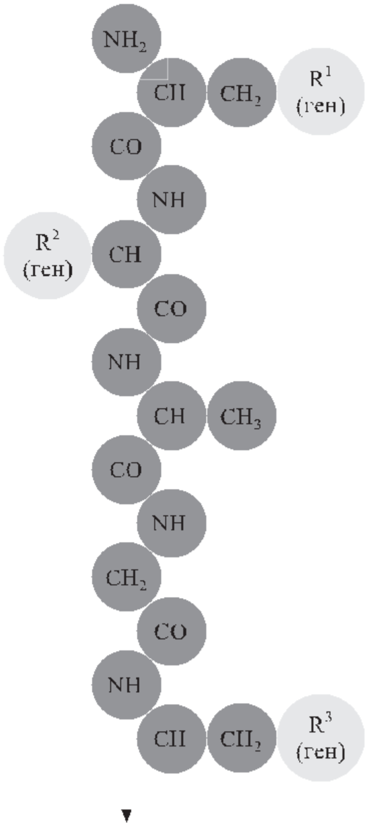


Рисунок 6.1

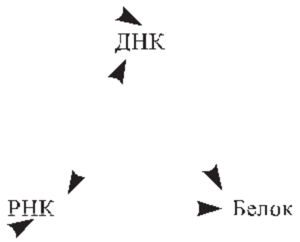
Схема опыта, доказывающего, что генетическим материалом фага Т2 является ДНК.

Белки фага мечены ^{35}S (светло-серый цвет), ДНК — ^{32}P (темно-серый цвет)

Результаты этого эксперимента прямо показали, что ДНК родительских фагов проникает в бактерии и затем становится составляющей развившихся новых фаговых частиц [см. дополнительно: Ратнер, 1998].

Современные представления о роли ДНК в передаче наследственной информации лучше всего отражает «центральная догма молекулярной биологии», сформулированная Ф. Криком в 1956 г. и доработанная в 70-х гг. (рис. 6.2).

Рисунок 6.2



«Центральная догма молекулярной биологии» [Crick, 1970].

Сплошные стрелки показывают обычный путь переноса генетической информации, пунктирные — более редкие пути, также, возможно, существующие в природе по мнению Ф. Крика

Дополнение 6.2

За исследования нуклеотидов и нуклеозидов Нобелевскую премию в 1957 г. получил Александр Тодд (A. Todd).

В 1969 г. Альфред Д. Херши (A.D. Hershey) получил Нобелевскую премию за открытие генетической структуры вирусов.

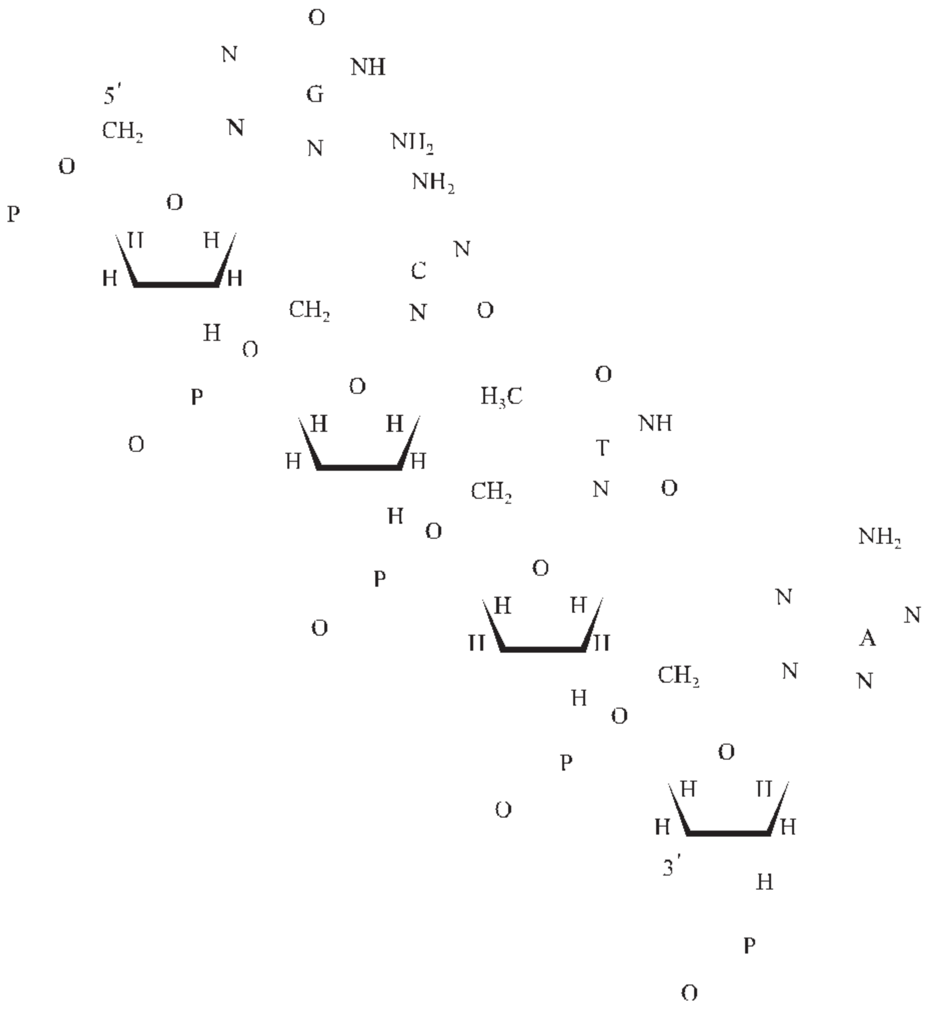
Автор предложил разделить все виды переноса биологической информации в клетке на три группы: 1) процессы, существование которых уже показано: ДНК → ДНК, ДНК → РНК, РНК → белок, РНК → РНК; 2) процессы, которые не были экспериментально выявлены и с теоретической точки зрения не казались строго необходимыми: РНК → ДНК, ДНК → белок; 3) невозможные переносы: белок → белок, белок → РНК, белок → ДНК. Таким образом, информация во всех случаях в клетке переносится однонаправленно по цепи: ДНК → РНК → белок. Белок не может служить матрицей для синтеза ДНК или РНК, поскольку у молекул белка нет свойства комплементарности отдельных частей молекулы, что позволяло бы использовать ее как матрицу.

6.2. СТРУКТУРА ДНК

Генетическая информация в молекуле ДНК записана в виде последовательности нуклеотидных остатков, которые содержат одно из четырех азотистых оснований: аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T) (рис. 6.3).

Азотистые основания делятся на два типа: пиримидиновые и пуриновые. Пиримидины состоят из шестичленного кольца, а у пуринов по два кольца: одно — пятичленное и второе — шестичленное. Каждая нуклеиновая кислота синтезируется из оснований только четырех типов. Одни и те же пурины (аденин и гуанин) входят в состав и ДНК, и РНК. Два пиримидина, входящие в состав ДНК, — это цитозин

Рисунок 6.3



Фрагмент одной цепи ДНК.

Пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T) и цитозин (C) прикреплены к полимерному остову, состоящему из чередующихся остатков фосфата (P) и сахара дезоксирибозы

и тимин, а в РНК вместо тимина находится урацил. Тимин отличается от урацила только наличием метильной группы в пятом положении пиримидинового кольца. Соединения, состоящие из остатков азотистого основания и углевода рибозы или дезоксирибозы, называются нуклеозидами. Присоединение к нуклеозидам фосфата дает нуклеотиды.

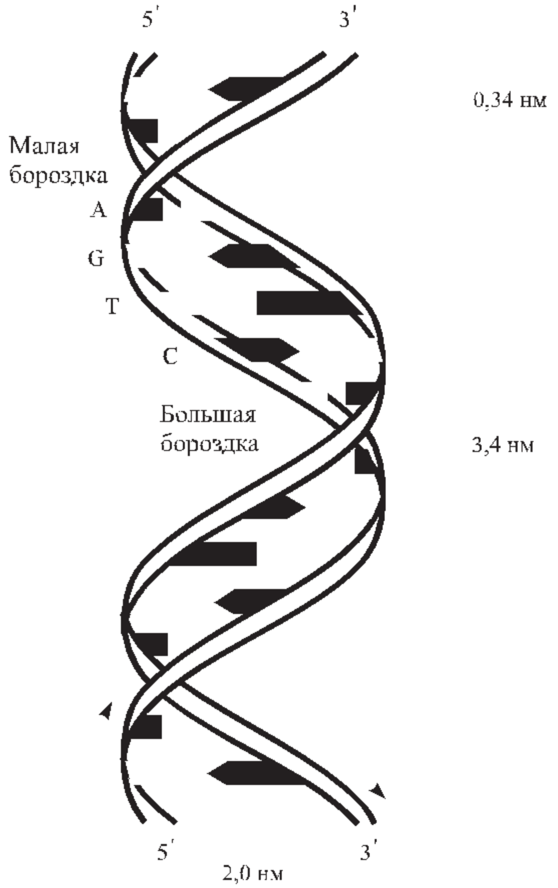
Дополнение 6.3

За открытие структуры нуклеиновых кислот Френсис Крик, Джеймс Уотсон и Морис Уилкинс (F. H. C. Crick, J. D. Watson, M. H. F. Wilkins) в 1962 г. были награждены Нобелевской премией.

Ниже приведены названия и принятые обозначения всех этих соединений:

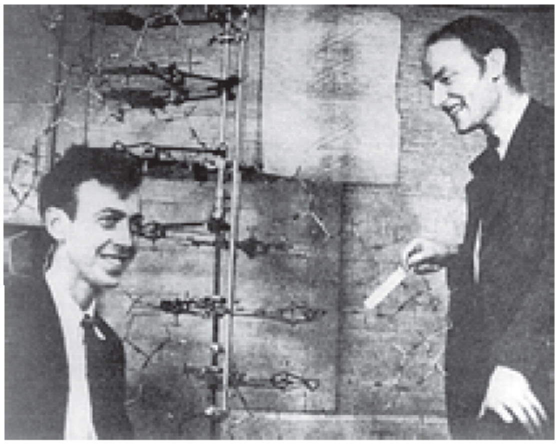
Основания	***Нуклеозиды***	***Нуклеотиды***
Аденин (A)	Аденозин	Адениловая кислота (AMP или dAMP)
Гуанин (G)	Гуанозин	Гуаниловая кислота (GMP или dGMP)
Цитозин (C)	Цитидин	Цитидиловая кислота (CMP или dCMP)
Тимин (T)	Тимидин	Тимидиловая кислота (dTMP)
Урацил (U)	Уридин	Уридиловая кислота (UMP)

Рисунок 6.4



Модель структуры ДНК по Уотсону и Крику

Рисунок 6.5



Дж. Уотсон (р. 1928) и Ф. Крик (1916 — 2004) у стереомодели молекулы ДНК

Модель ДНК в форме регулярной двойной спирали (рис. 6.4) была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком (рис. 6.5).

Каждая цепь содержит последовательность нуклеотидов, строго соответствующую последовательности другой цепи. Это соответствие достигается наличием водородных связей между направленными навстречу друг другу основаниями двух цепей: G и C или A и T. Таким образом, цепи комплементарны. Поскольку цепи имеют противоположную направленность в расположении 5' и 3' свободных концов в молекуле пентозы, их называют антипараллельными.

6.3. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

6.3.1. Механизмы репликации

Уотсон и Крик уже во второй своей работе 1953 г. предположили возможный механизм копирования наследственного материала. Легко представить, что цепи молекулы ДНК расходятся и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь (рис. 6.6). В результате образуются две дочерние двуспиральные молекулы ДНК, не отличимые от родительской молекулы.

Каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм копирования называется полуконсервативным. В то же время обсуждались две другие модели, одна из них «консервативная», другая — «дисперсионная» (рис. 6.7). Доказали существование полуконсервативного механизма М. Мезелсон и Ф. Сталь в 1958 г. Авторы выращивали бактерии *E. coli* несколько поколений на минимальной среде, в которой единственным источником азота был $^{15}NH_4Cl$ (хлорид аммония). В этом соединении нормальный изотоп ^{14}N был заменен на ^{15}N. В результате все клеточные компоненты бактерий, включая пурины и пиримидины в молекулах ДНК, содержали более тяжелый азот ^{15}N. Затем клетки переносили на среду с изотопом ^{14}N. Через 1 или 2 поколения выделяли ДНК и центрифугировали в градиенте CsCl. Фракции, со-

Дополнение 6.4

В 1959 г. Артуру Корнбергу (A. Kornberg) была присуждена Нобелевская премия за открытие механизма биосинтеза ДНК.

Рисунок 6.6

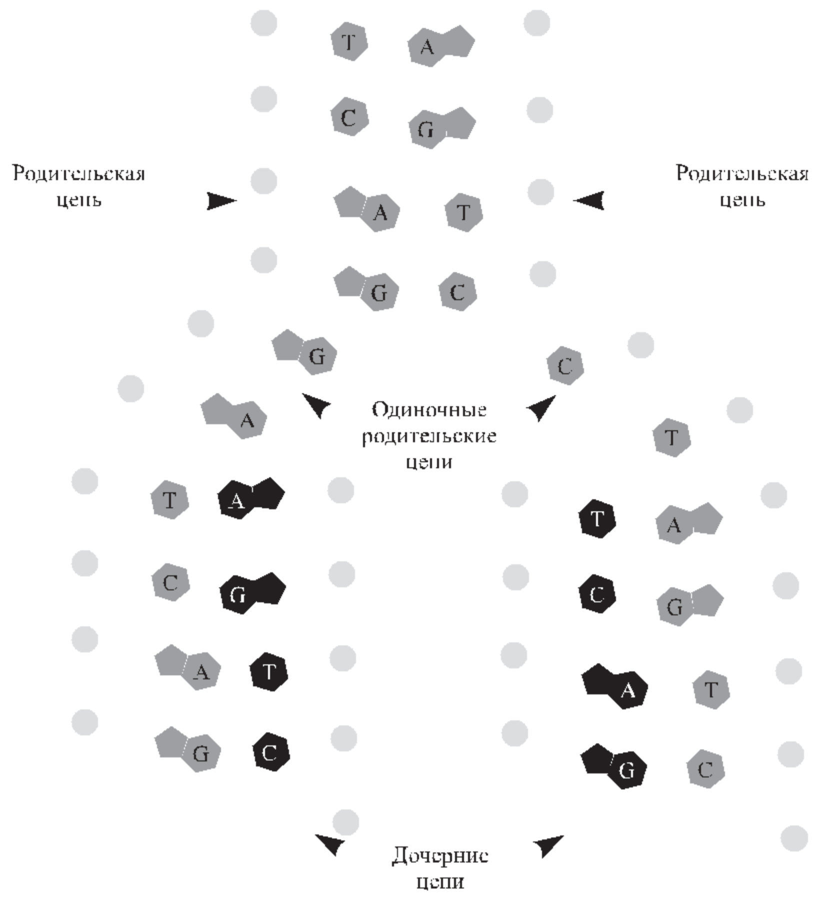
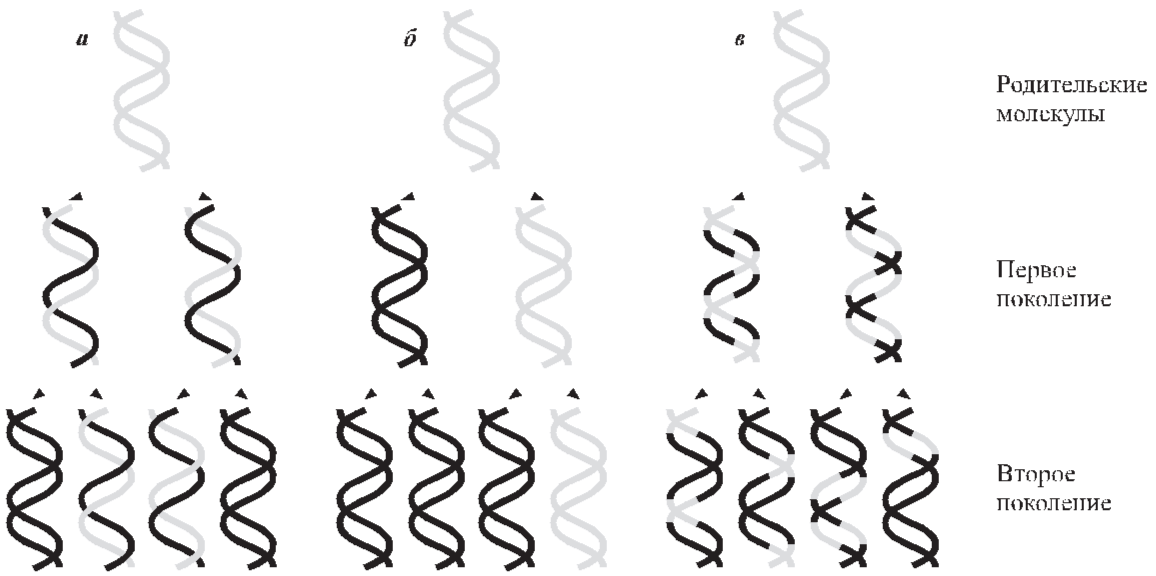


Схема полуконсервативной репликации ДНК

Рисунок 6.7



Модели репликации ДНК: *а* — полуконсервативная, *б* — консервативная, *в* — дисперсионная. Родительские цепи показаны серым цветом, вновь синтезированные — черным

Рисунок 6.8

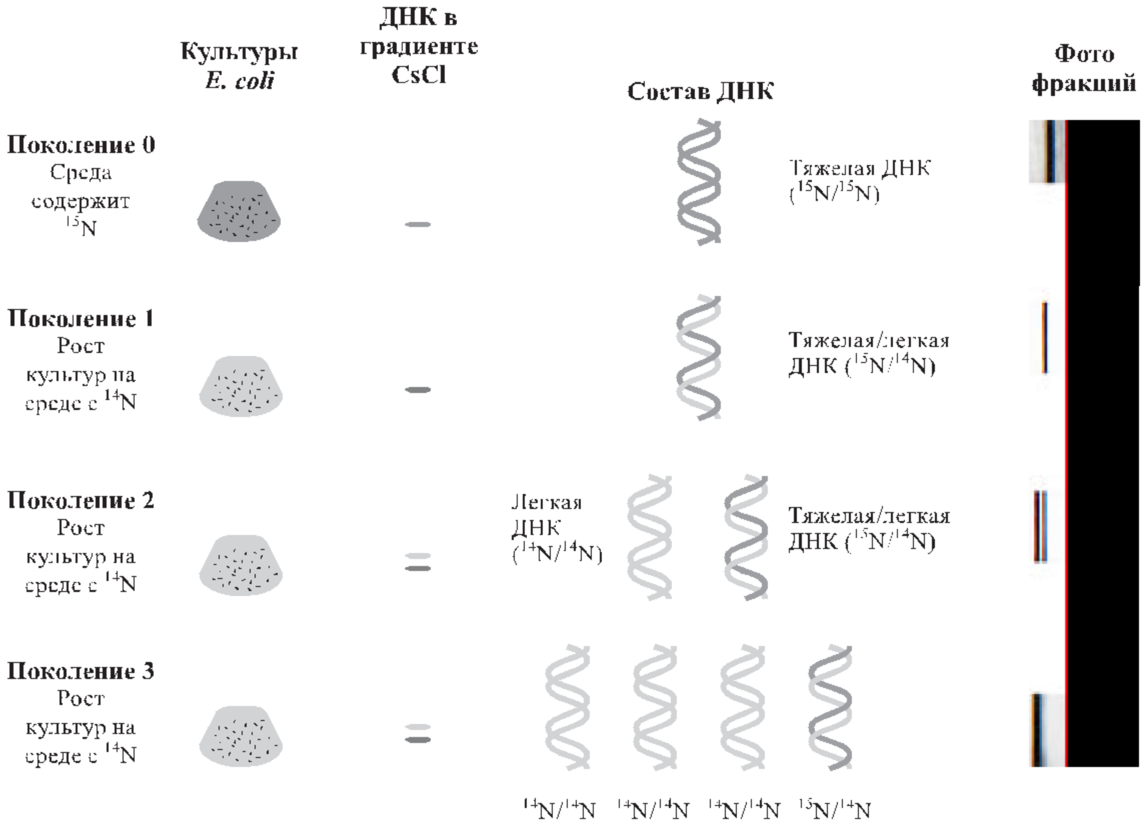


Схема опытов Мезелсона и Сталя, доказывающих полуконсервативность репликации ДНК [Russell, 1998. P. 346]

держащие легкие или тяжелые цепи, а также гибридные $^{15}N/^{14}N$ легко разделялись (рис. 6.8). ДНК, выделенная из бактерий первого поколения, дает при центрифугировании одну полосу, состоящую из гибридных $^{15}N/^{14}N$ цепей, второго поколения — две полосы: $^{14}N/^{14}N$ и $^{15}N/^{14}N$, что свидетельствует о полуконсервативной схеме репликации.

В 1957 г. А. Корнберг обнаружил у бактерии *E. coli* фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов — ДНК-полимеразу I. Открытие Корнберга показало, что в основе удвоения молекул ДНК лежат обычные биохимические реакции. По современным представлениям в репликации ДНК у прокариот выделяются следующие особенности.

Релаксация суперспирализованной ДНК. Этот процесс катализируется ферментом топоизомеразой.

Для того чтобы каждая из двух цепей ДНК стала матрицей для синтеза новой цепи, необходимо, чтобы нити ДНК расправились, или релаксировали. Суперспирализованное состояние молекулы ДНК может возникать из-за различных причин, например, в результате укладки в нуклеоиде или расплетения спирали в ходе репликации. При расплетении должно возни-

Дополнение 6.5

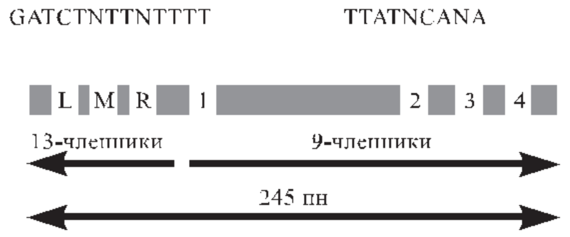
Все живые организмы на Земле обычно делят на прокариот и эукариот (от греч. карион — ядро). Главной особенностью прокариот является отсутствие у них в отличие от эукариот (от греч. эу — истинный) полноценного клеточного ядра, покрытого оболочкой. Генетический материал прокариот расположен в нуклеоиде — примитивном эквиваленте ядра эукариот. Клетки прокариот имеют очень небольшие размеры — около 1 мкм. Объем эукариотических клеток в 800–1000 раз больше объема клеток прокариот. К прокариотам относятся бактерии и археи (или архебактерии), предки которых возникли около 4 млрд лет назад. В последнее время все чаще говорят о трех царствах живых существ: бактериях, археях и эукариотах. Эукариоты могут быть как одноклеточными, так и многоклеточными. Они появились на Земле примерно через 500 млн лет после прокариот [Кулаев, 1998].

кать напряжение, которое приведет к отрицательной суперспирализации и вращению молекулы ДНК. Эту суперспирализацию снимает группа ферментов, называемых топоизомеразами. Топоизомераза I вносит временный разрыв в одну из цепей ДНК в области перед репликативной вилкой, что позволяет спирали ДНК вращаться вокруг своей оси. После снятия избыточного напряжения разорванная цепь восстанавливается. Топоизомераза II создает временный двухцепочечный разрыв, удерживая вместе оторванные друг от друга концы цепей. Присутствие этого фермента позволяет распутать сложные переплетения и узлы. Затем на релаксированный участок родительской молекулы ДНК, с которого начинается репликация и который называется точкой начала (или ориджином) репликации (*oriC*), садятся инициаторные белки.

Лучше изучены ориджины у *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Область начала репликации хромосомы, *oriC*, включает в себя участки с так называемыми ДНК-боксами и расположенными между ними короткими последовательностями. ДНК-боксы со специфическим «мотивом» нуклеотидов, преимущественно в 9 пн, перемежаются фрагментами в 12–13 пн с высоким содержанием АТ. Сами 9-членные последовательности могут располагаться как в прямом, так и в инвертированном порядке по отношению друг к другу. Например, у *B. subtilis* в участке R имеется один фрагмент TTATCCACA и два других девятичленных бокса, ориентированных в противоположном направлении, с заменой одной из пар нуклеотидов. Всего у *B. subtilis* на *oriC* расположено 15 ДНК-боксов. Область *oriC* очень консервативна: ДНК-боксы сходного состава имеются в соответствующем месте хромосомы у других бактерий (хотя у *Mycoplasma genitalium*, несмотря на наличие общих для всех бактерий ферментов репликации, ДНК-боксов найдено не было). Сами ДНК-боксы не кодируют белок или РНК, хотя между ними располагаются отдельные гены. Продукты этих генов также большей частью вовлечены в «обслуживание» репликации ДНК.

Схема абстрактного «минимального ориджина» представлена на рис. 6.9. Инициация репликации в *oriC* в системе *in vitro* начинается с формирования комплекса, в состав которого входят шесть белков: DnaA, DnaB, DnaC, HU, Gyrase и SSB. Сначала с 9-членной последовательностью связывается мономер DnaA, затем 20–40 мономеров этого белка формируют большой агрегат, ДНК ориджина опоясывает его, и цепи ДНК разъединяются в области трех 13-членных последовательностей. На следующем этапе DnaB/DnaC присоединяется к комплексу *oriC*/DnaA, формируя агрегат размером около 480 кДа, соответствующий сфере с радиусом 6 нм. В результате формируется вилка репликации.

Рисунок 6.9



Организация «минимального ориджина», состоящего из серии 9- и 13-членных повторов, расположенных на определенном расстоянии друг от друга [Lewin, 2000. P. 403]

Порядок расположения ДНК-боксов, промежуточных областей и их количество позволяют думать, что эволюционная дивергенция *oriC* шла главным образом за счет дупликаций и трипликаций.

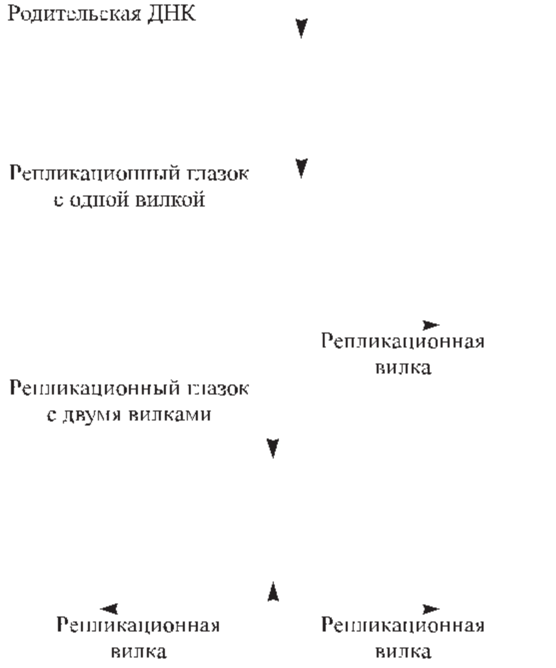
Область *oriC* у *E. coli* и *B. subtilis,* будучи лигированной с фрагментами некоторых плазмид, превращается в «мини-хромосому», способную к автономной репликации.

Денатурация и выпрямление двойной спирали ДНК. Эти процессы катализируются ферментом ДНК-геликазой. Поскольку синтез ДНК происходит на одноцепочечной матрице, ему должно предшествовать обязательное разделение двух цепей ДНК. Участок начала расхождения цепей называется репликационной вилкой из-за характерной Y-образной формы (рис. 6.10).

Именно в этой репликационной вилке ДНК-полимеразы синтезируют дочерние молекулы ДНК. Участок ДНК, в котором репликация уже завершилась, выглядит как пузырек или «глазок» в нереплицированной ДНК. Репликационные «глазки» образуются в тех местах, где находятся точки начала репликации, или ориджины.

Существуют различные методы для характеристики ориджинов репликации. Одним из наиболее современных является метод двумерного электрофореза реплицирующейся ДНК. Он основан на изменении электрофоретической подвижности молекулы ДНК в зависимости от изменения ее пространственной структуры, возникающей в ходе репликации. Вначале рестрикционные фрагменты ДНК разделяются в первом направлении по массе. Во втором направлении разделение больше за-

Рисунок 6.10



Образование репликационного «глазка» с одной или двумя репликационными вилками.

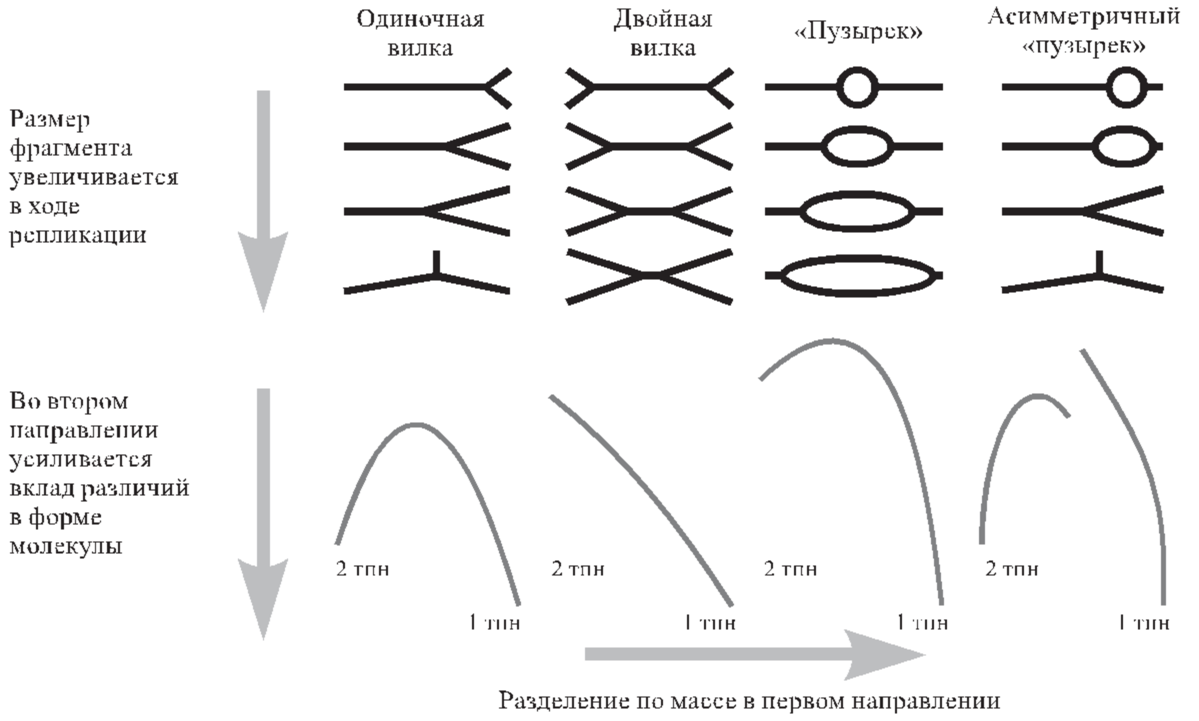
Тонкие стрелки указывают направление, в котором расплетается родительская ДНК, жирные — точки начала репликации

висит от формы молекулы. Разные типы реплицирующихся молекул создают характерные кривые (рис. 6.11). Фрагмент с одной вилкой создает простую кривую с точкой перегиба в положении, когда все три ветви имеют одинаковую длину и структура молекулы максимально отлична от линейной. Аналогичные рассуждения можно привести для фрагмента с двумя вилками или «пузырьком». Асимметричный пузырек описывается двумя кривыми с разрывом в точке, где «пузырек» превращается в Y-вилку, когда одна из вилок «добегает» до конца фрагмента ДНК.

Для того чтобы цепи ДНК разъединились, функционирует особый фермент — ДНК-геликаза (продукт гена *dnaB*), который связывается с белками, инициирующими процесс репликации, а затем переходит на молекулу ДНК. Этот фермент движется по одиночной цепи ДНК и, встречая участок двойной спирали, разрывает водородные связи между основаниями, разделяет цепи и продвигает репликационную вилку.

Прерывистая репликация отстающей цепи. Антипараллельная структура двух цепей молекулы ДНК создает ряд проблем для репликации. По мере движения вилки одновременно должны синтезироваться две дочерние цепи. Вилка движется в направлении от 5' к 3'

Рисунок 6.11

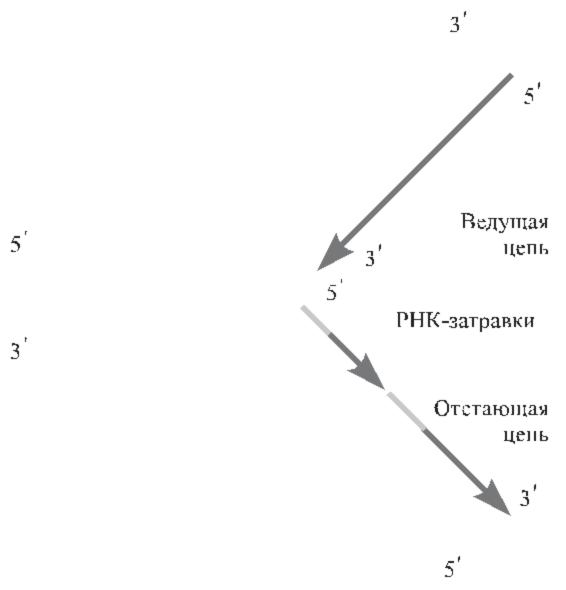


Зависимость формы кривой распределения реплицирующегося рестрикционного фрагмента в двумерном электрофорезе от положения ориджинов и числа вилок репликации [Lewin, 2000. P. 353]

на одной цепи и от 3' к 5' — на другой. Однако нуклеиновые кислоты синтезируются только от 5'- к 3'-концу. Проблема решается таким образом, что на одной из родительских цепей новая цепь синтезируется непрерывно в направлении 5'–3' (рис. 6.12), что совпадает с движением вилки репликации. Это лидирующая (или ведущая) цепь. Другая цепь — отстающая — растет за счет синтеза коротких фрагментов также от 5' к 3', однако они синтезируются в направлении, противоположном движению вилки. Длина фрагментов у прокариот составляет 1000–2000 пн. Они названы «фрагментами Оказаки» по имени открывшего их ученого.

Участие белков, расплетающих молекулу ДНК. Когда цепи ДНК разъединены, молекула становится довольно подвижной. Все возможные нарушения в структуре одиночных цепей исключаются благодаря действию белков SSB (single-strand DNA-binding proteins, или helix-destabilizing proteins). Они связываются с одиночными цепями, стабилизируют их, при этом не закрывая оснований и оставляя их доступными для ДНК-полимеразы. Тетрамер из четырех одинаковых субъединиц белка SSB связывается с сегментом ДНК длиной 32 пн. Более 200 молекул этого белка присутствуют в каждой репликационной вилке (рис. 6.13).

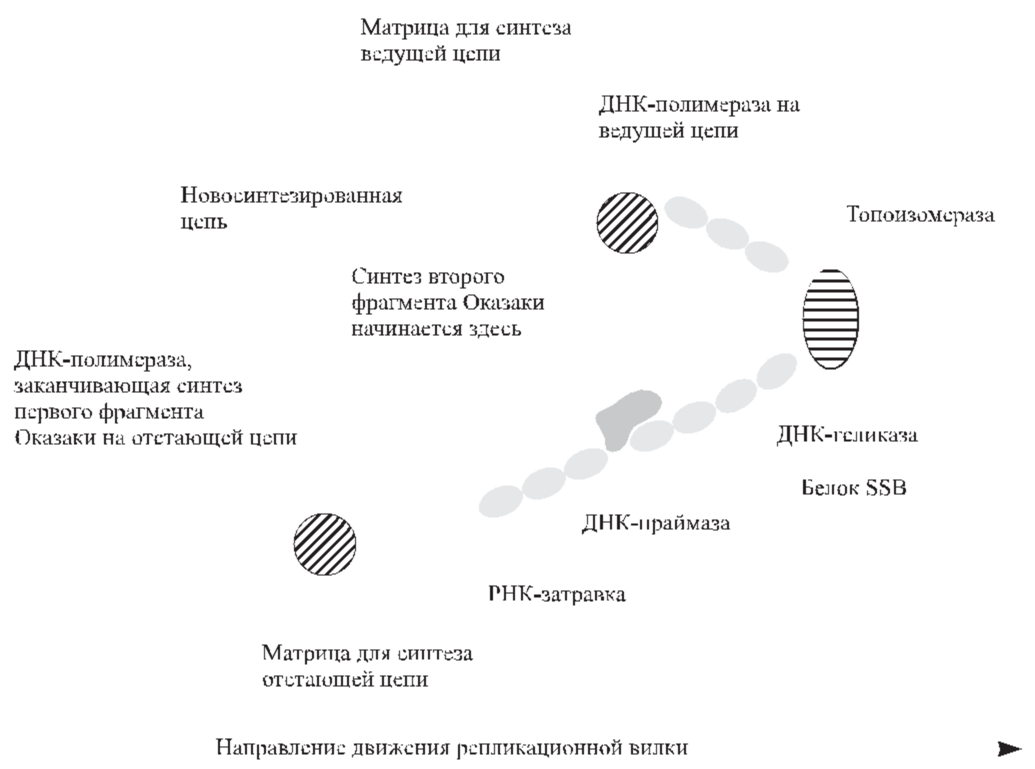
Рисунок 6.12



Строение репликационной вилки.

Направление синтеза ДНК совпадает с направлением расплетания двойной спирали лишь для одной из новосинтезированных цепей — ведущей. Вторая цепь — отстающая — синтезируется прерывисто, в виде коротких фрагментов Оказаки. В результате обе дочерние цепи растут в направлении от 5' к 3'

Рисунок 6.13



Расположение основных белков в репликационной вилке

Инициация синтеза новых цепей ДНК. ДНК-полимеразы не могут начинать синтез ДНК на матрице, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Такую заранее образованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют затравкой (или праймером) (см. рис. 6.12), она состоит из РНК. Короткую РНК-затравку синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов фермент, не обладающий корректирующей активностью и называемый ДНК-праймазой. Праймазная активность может принадлежать либо отдельному ферменту, либо одной из субъединиц ДНК-полимеразы. Праймаза связывается с геликазой и ДНК, формируя структуру, называемую праймосомой, и синтезирует РНК-праймер. РНК-праймеры удлиняются действием ДНК-полимеразы III, которая затем синтезирует новые цепи ДНК, комплементарные матричным цепям.

Действие ДНК-полимеразы III. ДНК-геликаза продолжает разделять цепи молекулы ДНК все дальше от точки инициации. На матрице лидирующей цепи постоянно синтезируется новая лидирующая цепь. На матрице отстающей цепи собираются SSB-белки, удерживая цепь в выпрямленном состоянии, затем синтезируются РНК-праймеры — процесс, катализируемый праймазой, которая все еще связана с геликазой. Праймер удлиняется за счет действия ДНК-полимеразы III, которая вытесняет белки SSB по мере синтеза нового фрагмента Оказаки.

Сшивка фрагментов отстающей цепи. Фрагменты Оказаки отстающей цепи сшиваются, образуя непрерывную цепь. Это требует активности двух ферментов: ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы. В это время ДНК-полимераза III отделяется от ДНК и ДНК-полимераза I продолжает синтез ДНК в направлении 5'–3', одновременно удаляя фрагмент РНК-праймера. После замены всех нуклеотидов РНК на нуклеотиды ДНК между двумя фрагментами ДНК остается одноцепочечная брешь, которая зашивается ДНК-лигазой.

Итак, процесс репликации у прокариот очень сложен. Сейчас известно, что ключевые белки процесса репликации тесно ассоциированы и формируют репликационную машину, или реплисому, с определенным расположением цепей ДНК и ферментов (рис. 6.14). Отстающая цепь изгибается так, что ее ДНК-полимераза III комплексирует с ДНК-полимеразой III лидирующей цепи. Этот изгиб подводит 3'-конец каждого уже синтезированного фрагмента Оказаки к участку, в котором начинается синтез нового фрагмента Оказаки. Комплекс праймаза–гелика-

Рисунок 6.14

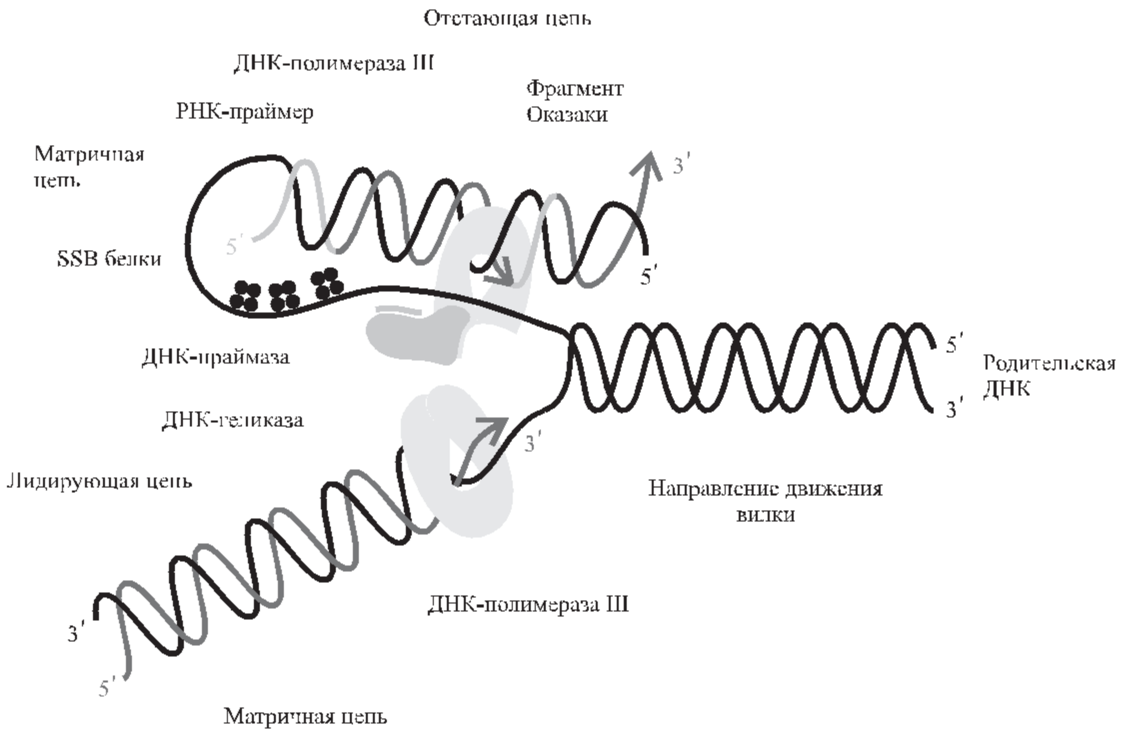


Схема репликации ДНК («модель тромбона»)

за движется вместе с вилкой репликации, синтезируя новые РНК-праймеры. ДНК-полимераза III на отстающей цепи используется вновь и вновь, продвигаясь вперед вместе с вилкой. Таким образом, ДНК синтезируется одинаково эффективно на обеих матричных цепях.

Коррекция ошибок в ходе репликации ДНК. Генетический материал живых организмов имеет огромные размеры и реплицируется с высокой точностью. В среднем в процессе воспроизведения генома млекопитающего, состоящего из ДНК длиной 3 млрд пар нуклеотидов, возникает не более трех ошибок. При этом ДНК синтезируется чрезвычайно быстро (скорость ее полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов в секунду у бактерий до 50 нуклеотидов в секунду у млекопитающих).

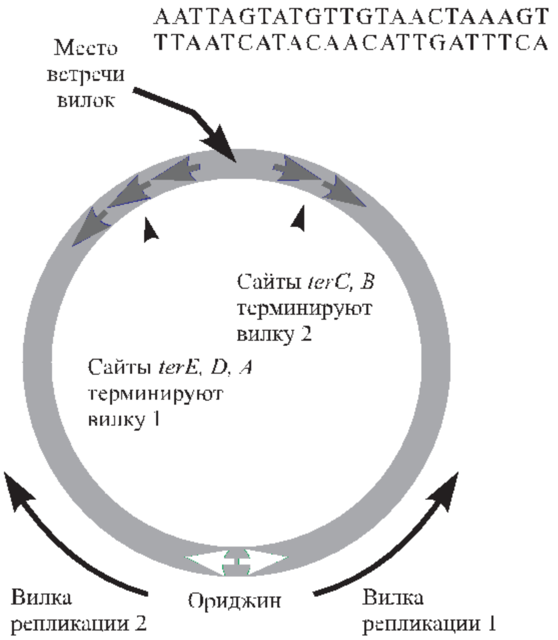
Высокая точность репликации, наряду с ее высокой скоростью, обеспечивается наличием специальных механизмов, осуществляющих коррекцию, т. е. устраняющих ошибки.

Суть механизма коррекции заключается в том, что ДНК-полимеразы дважды проверяют соответствие каждого нуклеотида матрице: один раз перед включением его в состав растущей цепи, второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь синтезируется лишь в том случае, если последний нуклеотид растущей цепи ДНК образовал правильную уотсон-криковскую пару с соответствующим нуклеотидом матрицы.

Репликация осуществляется дискретно. Единица длины ДНК, в которой происходит индивидуальный акт репликации, называется репликоном. Репликон содержит регуляторные элементы, необходимые для репликации. Он имеет ориджин, в котором репликация начинается, и может иметь терминатор репликации. Геном прокариотической клетки составляет единственный репликон, поэтому бактериальная хромосома является самым большим репликоном. Также отдельным репликоном является плазмида.

Терминация репликации. Последовательности, которые обеспечивают терминацию, у *E.coli* называются *ter*-сайтами. Они содержат короткую (около 23 пн) последовательность. В участке терминации находится несколько *ter*-сайтов (рис. 6.15). Они располагаются примерно на 100 тпн дальше точки, в которой встречаются вилки репликации. Для терминации необходим продукт гена *tus*, который опознает эту последовательность, связывается с ней и предотвращает дальнейшее продвижение вилки репликации.

Рисунок 6.15



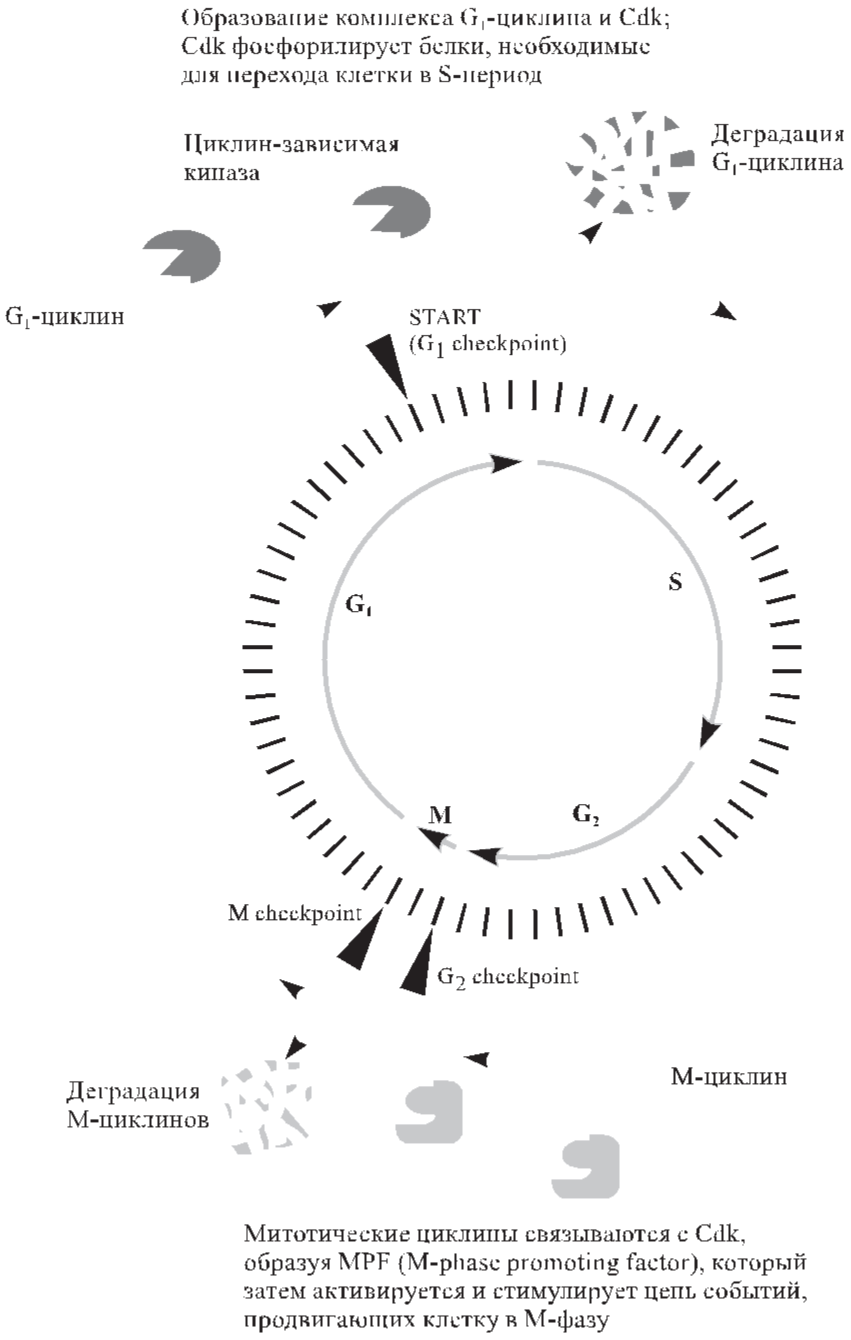
Локализация терминаторов репликации у *E.coli* [Lewin, 2000. P. 354]

6.3.2. *Особенности репликации ДНК у эукариот*

Молекулярно-биологические процессы, происходящие во время репликации ДНК, в основном похожи у эукариот и прокариот. Тем не менее существуют и различия. Во-первых, репликация ДНК у эукариот происходит на определенной стадии клеточного цикла. Во-вторых, если бактериальная хромосома представляет собой единицу репликации — репликон, то репликация ДНК эукариотической хромосомы осуществляется посредством разделения ее на множество отдельных репликонов. По эукариотической хромосоме в каждый момент времени может двигаться независимо друг от друга множество репликационных вилок. Остановка продвижения вилки происходит только при столкновении с другой вилкой, движущейся во встречном направлении, или по достижении конца хромосомы. В результате вся ДНК хромосомы в короткий срок оказывается реплицированной.

Репликация в клеточном цикле. Клеточные циклы у эукариот качественно не различаются у разных видов и в клетках разных тканей одного вида. Замечены различия, главным образом, в длительности цикла. Среди высших эукариот некоторые клетки делятся через 10 минут, другие через 3 часа, третьи — через 200 часов.

Рисунок 6.16



Некоторые события, контролирующие прохождение через клеточные циклы у дрожжей [Russell, 1998. P. 362]

Точки проверки обозначены черными треугольниками

Клеточный цикл у большинства соматических клеток высших эукариот подразделяют на 4 стадии: G_1 (gap1, предсинтетический период, или период подготовки к синтезу ДНК), S (synthesis, период синтеза ДНК), G_2 (gap 2, постсинтетический период подготовки к клеточному делению) и М (mitosis, собственно процесс клеточного деления). Иногда выделяют G_0 — стадию между М и G_1. В культуре клеток человека весь цикл занимает примерно 24 ч, при этом на стадии G_1, S, G_2 и М приходится 10, 9, 4 и 1 ч соответственно. Фазы G_1, S и G_2 вместе составляют интерфазу. Наиболее детальные сведения получены при изучении клеточных циклов дрожжей (рис. 6.16). Данные генетических и молекулярных исследова-

ний показали, что клеточные циклы включают ряд этапов, на которых осуществляется контроль продвижения клетки от одной фазы к другой — точки проверки (checkpoints). Первая стадия проверки у дрожжей называется START, у млекопитающих — G_1 checkpoint. Если клетка не выросла до необходимых размеров и окружающая среда недостаточно хороша, клетка будет оставаться в G_1, т. е. не будет сигнала к синтезу ДНК (S-период).

В S-фазе разные участки генома реплицируются, по-видимому, в разное время. В культуре клеток человека сначала синтезируется ДНК, которая выявляется в R-бэндах метафазных хромосом (см. разд. 9.4.3), которые обогащены генами. В конце S-периода синтезируется ДНК G-бэндов. Полагают, что между этими отрезками S-периода также существует стадия проверки (проверка целостности ДНК, checkpoint DNA integrity).

Стадия проверки G_2 находится на границе G_2 и M. Если не завершилась репликация всей ДНК, если клетка не выросла до нормальных размеров и окружающая среда недостаточно хороша, клетка не способна перейти к стадии M.

Третья проверка происходит в течение фазы M: хромосомы должны быть надежно прикреплены к нитям митотического веретена, чтобы начать разделение хроматид.

Ключевыми компонентами, вовлеченными в регуляторные события, являются белки, известные под названием циклинов (cyclins) и циклин-зависимых киназ (Cdk). У дрожжей в стадиях проверки G_1 и G_2 функционирует одна и та же Cdk, у млекопитающих — две разные. Специфичность каждой из стадий проверки определяется типом участвующих в этом циклинов.

В стадии проверки G_1 у дрожжей (START) один или более G_1-циклинов связывается с Cdk (CDC28/cdc2 киназой) и активирует ее. Затем Cdk фосфорилирует ключевые белки, необходимые для перехода в S-период. Как только циклин активирует Cdk, уровень циклинов уменьшается из-за усиления процессов протеолиза.

Аналогичный процесс протекает на стадии проверки G_2, когда один или более митотических циклинов связывается с Cdk с образованием комплекса, стимулирующего переход к M-фазе, — MPF (M-phase promoting factor). Затем, когда другие ферменты фосфорилируют и дефосфорилируют его, MPF активируется и стимулирует события, необходимые для перехода клетки в митотическую стадию.

В ходе митоза, сразу после метафазы, митотический циклин деградирует, что приводит к инактивации MPF, позволяющей клетке завершить митоз (см. рис. 6.16).

Полирепликонность у эукариот. У дрозофилы в ходе раннего эмбрионального развития (первые два часа после оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом) ядра делятся каждые 9,6 мин (при 24 °C). Так как интерфаза в этих делениях занимает 3,4 мин, можно предположить, что каждая молекула ДНК реплицируется в течение этого короткого периода. Если размер генома дрозофилы составляет 185 000 тпн и скорость репликации — 2,6 тпн/мин, число репликонов должно составлять около 20 тыс.

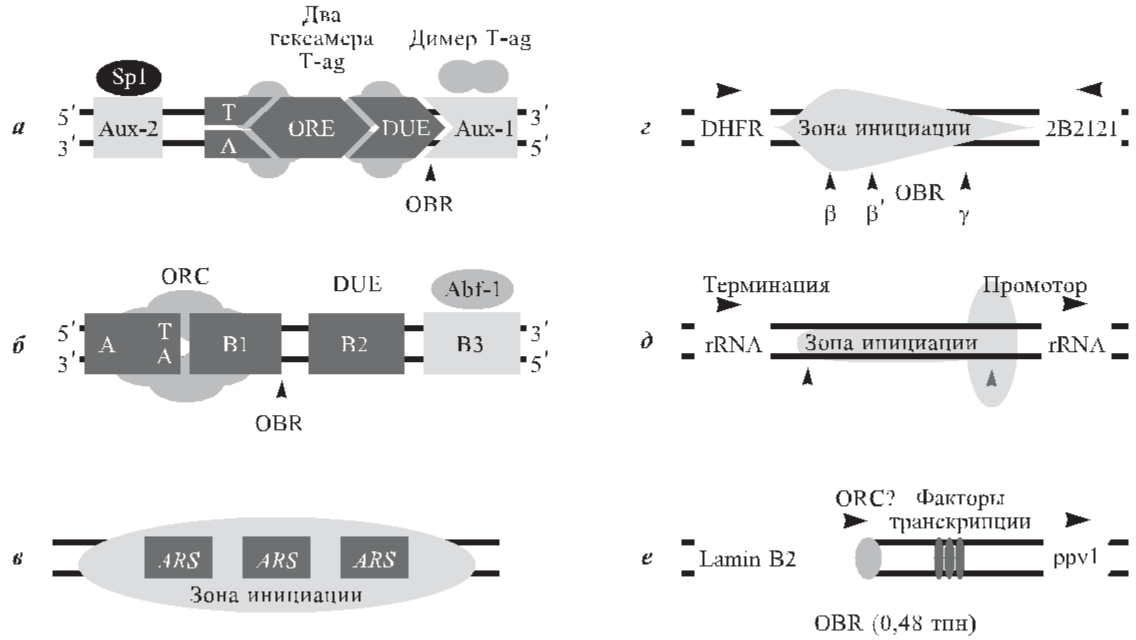
Однако как скорость репликации, так и размеры и число репликонов тканеспецифичны. У той же дрозофилы в культуре соматических клеток продолжительность S-фазы составляет 600 мин. Аналогичные различия в продолжительности S-фазы найдены у тритона (1 ч в ядрах бластулы и 200 ч в предмейотической S-фазе сперматоцитов). Полагают, что длительность S-фазы определяется не скоростью синтеза ДНК, а числом ориджинов репликации. В ДНК клеток нейрулы тритона они находятся на расстоянии около 40 мкм друг от друга, а в соматических клетках — около 100 мкм [Blumenthal et al., 1974; Callan, 1973].

Ориджины репликации у эукариот. Полагают, что у эукариот гомологами ориджинов репликации являются автономно реплицирующиеся последовательности, или *ARS* (autonomously replicating sequences), открытые в 1980 г. Р. Дэйвисом и Дж. Карбоном. Сначала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были выделены особые последовательности, которые, будучи включенными в экстрахромосомную ДНК, обеспечивали репродукцию этих ДНК в дрожжевой клетке. Позднее такие последовательности были найдены у многих других организмов. Коровая часть ориджина репликации у вируса SV40 (рис. 6.17, *а*) состоит из элемента опознания (ORE — origin recognition element), необходимого для связывания особого белка — Т-антигена (T-ag), белка, расплетающего ДНК (DUE — DNA unwinding element), и элемента, обогащенного AT-нуклеотидами. Участок, с которого вилка репликации начинает двигаться в противоположных направлениях, называется началом двунаправленной репликации (OBR — origin bidirectional replication).

Вспомогательные элементы (Aux) связывают димеры Т-антигена (Aux-1) и фактор транскрипции Sp1 (Aux-2). Расстояние между этими элементами и их ориентация играют важную роль в процессе инициации репликации.

У *S. cerevisiae* (см. рис. 6.17, *б*) ориджины состоят из двух коровых элементов (A и B1),

Рисунок 6.17

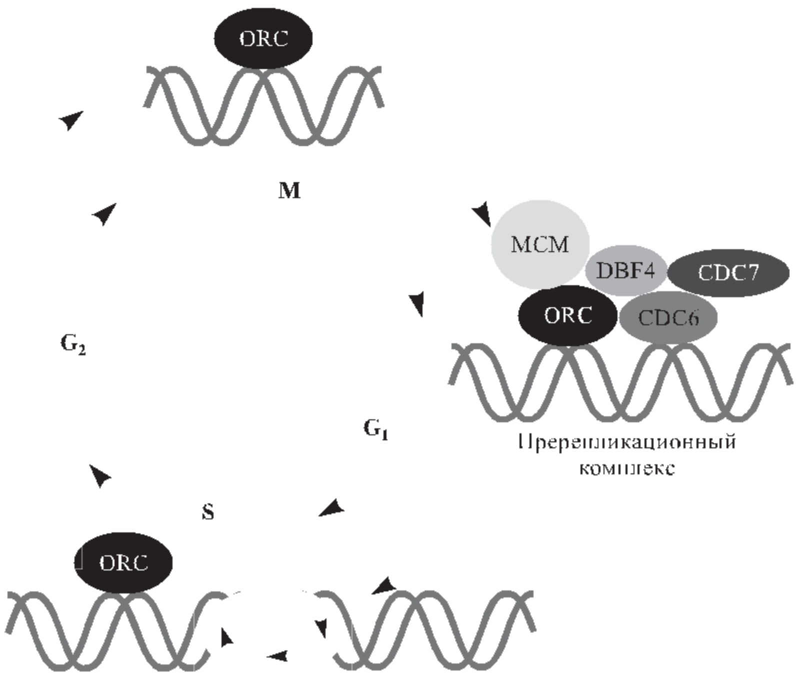


Ориджины репликации, функционирующие в ядрах эукариотических клеток и у инфицирующего их вируса SV40 [DePamphilis, 1999]:

а — SV40; *б* — *S. cerevisiae*; *в* — *S. pombe*; *г–е* — млекопитающие.

Зеленым помечены элементы генома, абсолютно необходимые для инициации репликации (коровые компоненты), желтым — последовательности ДНК (сайты связывания факторов транскрипции), которые облегчают процесс репликации при некоторых условиях — это вспомогательные компоненты

Рисунок 6.18



Формирование пререпликационного комплекса в сайте взаимодействия *ARS*–ORC у дрожжей [Marx, 1995].

CDC6, MCM, CDC7 (киназа), DBF4 — белки, входящие в состав комплекса ORC

составляющих сайт связывания белков, инициирующих процесс репликации и входящих в комплекс ORC. Элемент DUE обычно содержит генетически охарактеризованный участок B2. Некоторые ориджины включают вспомогательный элемент B3, связывающий фактор транскрипции Abf-1. Общая длина *ARS*-элемента составляет 100–200 пн.

У другого вида дрожжей, *S. pombe*, ориджины состоят по крайней мере из одной *ARS*, которая значительно длиннее, чем у *S. cerevisiae*. В некоторых случаях несколько *ARS*-элементов формируют зону инициации репликации (*в*).

У млекопитающих ориджины не охарактеризованы детально, некоторые располагаются в межгенных промежутках (*г*, *д*). Другой тип ориджинов содержит только районы инициации двунаправленной репликации — OBR (*е*).

С *ARS* связываются белки комплекса ORC. Комплекс был открыт в 1992 г., он состоит из 6 белков. В результате мутаций в участках *ARS* комплекс ORC не связывается с ДНК. И наоборот, мутации в белках ORC предотвращают инициацию репликации в сайтах *ARS*. Однако, как оказалось, комплекс ORC остается связанным с ориджинами на протяжении всего клеточного цикла, и его присутствие не инициирует процесс репликации ДНК. Это означает, что должны существовать другие, дополнительные факторы, и вскоре они были открыты. Ими оказались белки так называемого пререпликационного комплекса (рис. 6.18).

В дифференцированных клетках млекопитающих пререпликационные комплексы образуются в специфических участках хромосом в фазе G_1 и затем разрушаются в ходе митоза. Инициация репликации зависит от многих условий: структуры хроматина, наличия определенных последовательностей ДНК, метилирования ДНК.

Большинство, если не все белки, участвующие в инициации репликации ДНК у дрожжей, вовлечены в аналогичные процессы у Metazoa [DePamphilis, 1999] (рис. 6.19).

В ходе клеточного цикла вначале с нуклеосомами (см. гл. 11) связываются шесть белков, входящих в состав ORC, затем в ранней G_1-фазе — Cdc6 (cell division cycle protein) и еще шесть белков Mcm (mini chromosome maintenance protein). У ксенопуса для связывания Mcm требуется наличие дополнительного фактора RLF-B (replication licensing factor B). Белки Mcm обнаруживают аффинность к гистонам, а не к ДНК, в результате чего в конце G_1-фазы весь пререпликационный комплекс прочно привязывается к хроматину непосредственно в участке ориджина репликации или рядом с ним. Несколько позже у дрожжей Cdc6 заменяется на Cdc45, и происходит это с помощью протеинкиназной активности белка Cdc28/Ckb5,6. У Metazoa происходит то же самое при помощи белка Cdk2/Cyclins A,E. Образуется преинициирующий комплекс. Он активируется протеинкиназами Cdc7/Dbf4, что стимулирует начало репликации ДНК. Связавшись с ДНК, белки ORC остаются там до конца клеточного цикла (у дрожжей). У млекопитающих они удаляются из хроматина в ходе митоза и возвращаются в начале S-фазы.

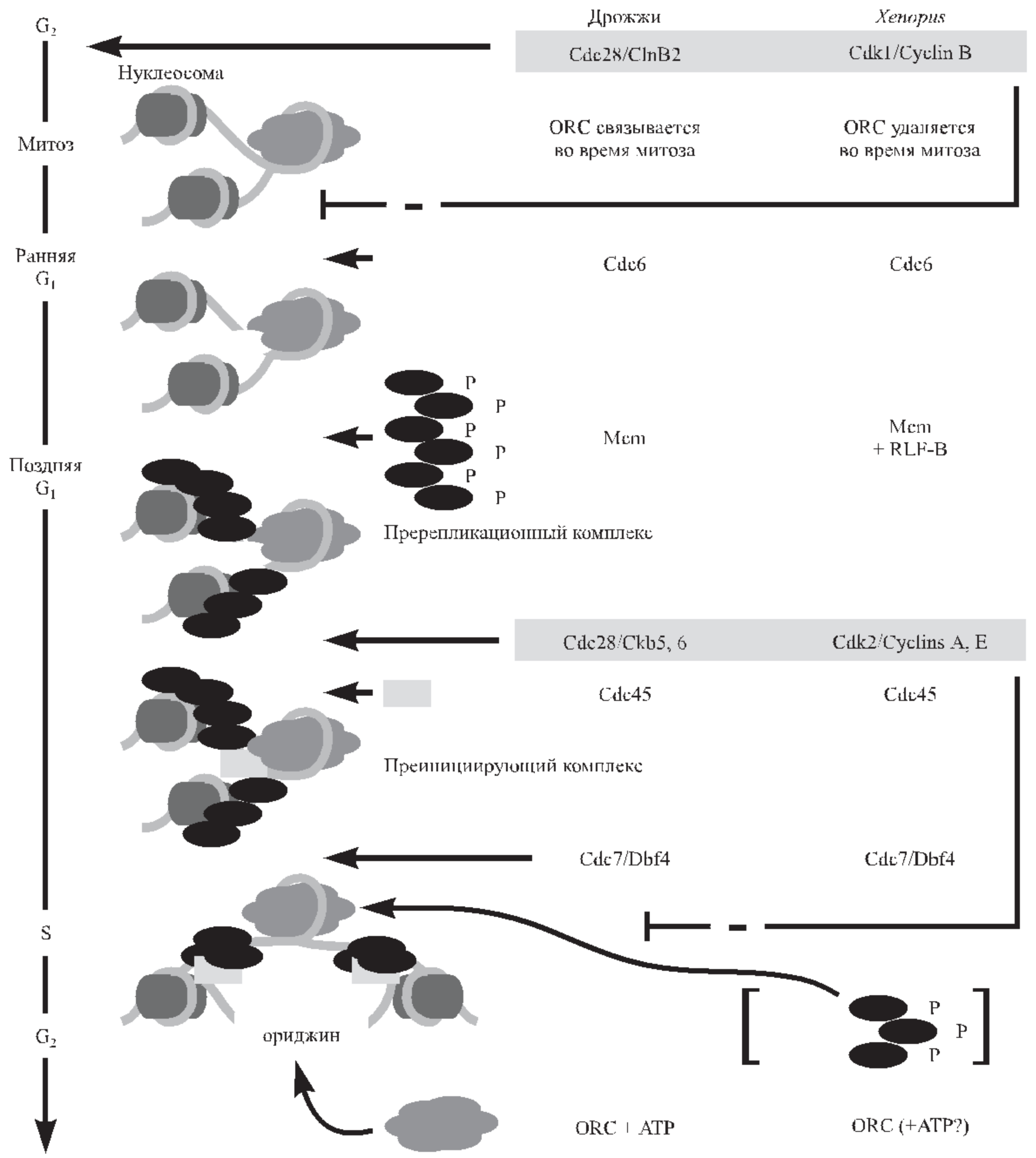
Параметры репликации у эукариот. Насколько велики репликоны и как много их в геноме? Трудность определения размеров и числа репликонов заключается в выделении индивидуальных «глазков» репликации. Всегда остается вероятность, что наблюдаемый «глазок» является результатом слияния двух соседних репликонов. Чтобы обойти это препятствие, подбирают стадию репликации, когда число «глазков» максимально и они еще не начали сливаться. Затем в участке ДНК, содержащем несколько «глазков», измеряют расстояние между точками начала репликации (т. е. между средними точками смежных репликонов). Скорость движения вилки репликации определяют по максимальной длине радиоактивно меченого следа, оставляемого реплицирующейся ДНК в единицу времени.

Как свидетельствуют данные табл. 6.1, размеры репликонов у эукариот существен-

Таблица 6.1. Параметры репликации ДНК в геномах эу- и прокариот [Lewin, 1994. P. 536]

Организмы	Число репликонов	Средняя длина репликона (тпн)	Скорость движения вилки репликации (тпн/мин)
Бактерии (*Escherichia coli*)	1	4 200	50
Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	500	40	3,6
Насекомые (*Drosophila melanogaster*)	3 500	40	2,6
Амфибии (*Xenopus laevis*)	15 000	200	0,5
Млекопитающие (*Mus musculus*)	25 000	150	2,2
Растения (*Vicia faba*)	35 000	300	Нет данных

Рисунок 6.19



Формирование и активирование пререпликационных комплексов у дрожжей *S. cerevisiae* и лягушки *Xenopus laevis* [DePamphilis, 1999]

но меньше, чем у прокариот, хотя в пределах генома одного вида они могут варьировать в 10 раз. Скорость репликации у эукариот ниже.

В соответствии с современными представлениями репликоны у эукариот распределены в геноме не случайно, они расположены группами (replicon foci). В этих группах, или фокусах, собираются ферменты репликации, которые удлиняют вилки репликации одновременно 10–100 соседних репликонов длиной примерно по 100 тпн каждый. Репликация в них завершается за 45–60 мин. Кроме этого существуют очень длинные репликоны (более 1000 тпн) — столь большие, что репликация в них продолжается по нескольку часов.

Особенности репликации ДНК на концах хромосом рассмотрены отдельно в разд. 9.6.

Литература к разделам 6.1–6.3

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 5 т. Т. 2. М.: Мир, 1994. С. 287–301.

Докинз Р. Эгоистичный ген. М.: Мир, 1993. 316 с.

Кольцов Н. К. Наследственные молекулы // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 93–119. (Наука и жизнь. 1935. Вып. 5, 6).

Кулаев И. С. Происхождение эукариотических клеток // Соросовский образовательный журн. 1998. № 5. С. 17–22.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. С. 23–36.

Прозоров А. А. Геном бактерий: нуклеоид, хромосома, нуклеотидная карта // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 437–451.

Ратнер В. А. Хроника великого открытия: идеи и лица // Природа. 1998. № 4. С. 68–79. № 11. С. 18–28.

Сельскохозяйственная биотехнология / Ред. В. С. Шевелуха. М.: Высш. шк., 1998. С. 87–109.

Фаворова О. О. Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК // Соросовский образовательный журн. 1996. № 4. С. 11–17.

Чолаков В. Нобелевские премии. Ученые и открытия. М.: Мир, 1987. 363 с.

Berezney R., Dubey D. D., Huberman J. A. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci // Chromosoma. 2000. Vol. 108. P. 471–484.

Blumenthal A. B., Kriegstein H. J., Hogness D. S. The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1974. Vol. 38. P. 205–233.

Callan H. G. Replication of DNA in eukaryotic chromosomes // British Medical Bulletin. 1973. P. 192–195.

Crick F. Central dogma of molecular biology // Nature. 1970. Vol. 227. P. 561–563.

DePamphilis M. L. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? // BioEssays. 1999. Vol. 21. P. 5–16.

Fetni R., Drouin R., Richer C.-L., Lemieux N. Complementary replication R- and G-band patterns induced by cell blocking at the R-band/G-band transition, a possible regulatory checkpoint within the S phase of the cell cycle // Cytogenet. Cell Genet. 1996. Vol. 75. P. 172–179.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 527–603.

Lewin B. Genes VII. Oxford: Oxford University Press, 2000. P. 349–414, 835–860.

Marx J. How DNA replication originates // Science. 1995. Vol. 270. P. 1585–1587.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 344–366.

Watson J. D., Crick F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. Vol. 171. P. 737–738.

Watson J. D., Crick F. H. C. General implications of the structure of deoxyribonucleic acid // Nature. 1953. Vol. 171. P. 964–967.

Wilkins M. H. F., Stikes A. R., Wilson H. R. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids // Nature. 1953. Vol. 171. P. 738–740.

6.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

В любом данном участке ДНК только одна из двух нитей ДНК кодирует аминокислоты, поэтому код — это последовательность нуклеотидов, а не пар нуклеотидов. Генетический код имеет следующие свойства:

1. Генетический код читается группами по три нуклеотида, т. е. код триплетный. Каждый триплет кодирует одну аминокислоту, каждый триплет называется кодоном (табл. 6.2).

2. Код неперекрывающийся. Основные закономерности организации генетического кода были открыты с помощью генетического анализа района *rII* фага Т4. В 1961 г. Ф. Крик и его коллеги показали, что код должен читаться неперекрывающимися триплетами с фиксированной стартовой точки.

Неперекрывание подразумевает, что каждый кодон состоит из трех нуклеотидов и каждый последующий кодон представлен следующими тремя нуклеотидами.

Фиксированная стартовая точка означает, что считывание начинается на одном конце и завершается на другом; различные части кодирующей последовательности не могут считываться независимо друг от друга. Началом синтеза белка для любого гена является кодон AUG. В конце гена обязательно стоят кодоны UAA, UAG или UGA, которые не кодируют аминокислот и являются сигналами на окончание синтеза белка — стоп-кодоны. Для повышения надежности процесса терминации стоп-кодоны обычно дублируются. Первым при этом, как правило, выступает кодон UAA (основной

Дополнение 6.6

Проблема кодирования в молекулярной биологии была впервые поставлена Г. А. Гамовым еще в начале 50-х гг., т. е. задолго до открытия самой мРНК. Размышляя над тем, как линейная последовательность четырех различных нуклеотидов может определить последовательность двадцати разных аминокислот в белке, Гамов предположил, что генетический код является триплетным. Он же поставил вопросы и о других свойствах генетического кода: перекрываемости, запятых между кодонами, вырожденности [Crick, 1966; Ратнер, 1998].

Таблица 6.2. Соответствие кодонов генетического кода аминокислотам белка

Первая буква в кодоне (5′)	Вторая буква в кодоне				Третья буква в кодоне (3′)
	U	C	A	G	
U	Фен (F)	Сер (S)	Тир (Y)	Цис (C)	U
	Фен (F)	Сер (S)	Тир (Y)	Цис (C)	C
	Лей (L)	Сер (S)	Stop	Stop	A
	Лей (L)	Сер (S)	Stop	Трп (W)	G
C	Лей (L)	Про (P)	Гис (H)	Арг (R)	U
	Лей (L)	Про (P)	Гис (H)	Арг (R)	C
	Лей (L)	Про (P)	Глн (Q)	Арг (R)	A
	Лей (L)	Про (P)	Глн (Q)	Арг (R)	G
A	Иле (I)	Тре (T)	Асн (N)	Сер (S)	U
	Иле (I)	Тре (T)	Асн (N)	Сер (S)	C
	Иле (I)	Тре (T)	Лиз (K)	Арг (R)	A
	Мет (M)	Тре (T)	Лиз (K)	Арг (R)	G
G	Вал (V)	Ала (A)	Асп (D)	Гли (G)	U
	Вал (V)	Ала (A)	Асп (D)	Гли (G)	C
	Вал (V)	Ала (A)	Глу (E)	Гли (G)	A
	Вал (V)	Ала (A)	Глу (E)	Гли (G)	G

Примечание. U — урацил, C — цитозин, A — аденин, G — гуанин; F, L, I и т. д. — однобуквенные сокращения названий аминокислот; Фен, Сер и т. д. —трехбуквенные сокращения. Кодоны UAA, UAG, UGA не кодируют аминокислот и являются сигналами терминации трансляции — стоп-кодонами. Кодон AUG является стартовым в трансляции.

терминирующий триплет), а вслед за ним на очень близком расстоянии в той же рамке считывания следует один из запасных терминирующих триплетов — UAG или UGA.

Если генетический код считывается неперекрывающимися триплетами, есть только три возможности транслирования нуклеотидной последовательности в аминокислотную, в зависимости от стартовой точки.

ACG ACG ACG ACG ACG ACG
CGA CGA CGA CGA CGA CGA
GAC GAC GAC GAC GAC GAC

Нуклеотидная последовательность, которая начинается с инициирующего кодона, делит последующие нуклеотиды на триплеты, кодирующие аминокислоты, и заканчивается терминирующим кодоном, называется рамкой считывания. Интервал между стартовым и стоп-кодоном называется открытой рамкой считывания (ORF).

Мутация, в результате которой инсертируется или делетируется один нуклеотид и изменяется рамка считывания, называется сдвигом рамки. Поскольку последовательность новой рамки считывания полностью отлична от первоначальной, вся дальнейшая аминокислотная последовательность будет измененной после мутации. Функция такого белка полностью утрачена.

GCU GCU GCU GCU GCU GCU GCU
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

Вставка A ↓

GCU GCU AGC UGC UGC UGC UGC
Ala Ala Ser Cys Cys Cys Cys

Делеция G ↑

GCU GCU AGC UGC UCU GCU GCU
Ala Ala Ser Cys Ser Ala Ala

Генетический материал мелкого бактериофага ϕX174 представлен одноцепочечной ДНК и состоит всего из 9 генов, продукты которых хорошо изучены. ДНК, необходимая для кодирования этих продуктов, должна бы состоять минимум из 6078 нуклеотидов. На самом же деле в хромосоме фага ϕX174 5374 нуклеотида. Этот парадокс удалось разрешить лишь после того, как в 1978 г. группой Ф. Сэнгера было проведено полное секвенирование ДНК этого фага. Оказалось, что кодирующие последовательности двух генов (*B* и *E*) локализованы внутри кодирующих последовательностей двух других генов (*A* и *D*). При этом рамка считывания (т. е. триплет, прочитываемый при трансляции) в каждом случае оказывалась сдвинутой на одну пару нуклеотидов. Например, в определенном участке внутри гена *D* находится последовательность

GTTTATGGTACG ,

которая в полипептиде D кодирует последовательность валин–тирозин–глицин–треонин. Рамка считывания гена *E* смещена вправо на один нуклеотид от рамки считывания гена *D*. Поэтому триплет ATG распознается как стартовый, и в полипептиде E появляется формилметионин, за которым последует валин, кодируемый триплетом GTA, и т. д.

Сходным образом кодирующая последовательность гена *B* оказывается внутри кодирующей последовательности гена *A*. В результате сдвига рамки считывания кодируемые перекрывающимися генами полипептиды полностью отличаются друг от друга по последовательностям аминокислот.

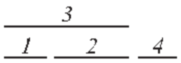
Дополнение 6.7

В 1968 г. за открытие и интерпретацию генетического кода и его функции в белковом синтезе Нобелевская премия была присуждена Р. Холли (R. Holley), Х. Хоране (H. Khorana) и М. Ниренбергу (M. Nirenberg).

Таблица 6.3. Аминокислоты и соответствующие им кодоны

A	Ala	Аланин	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Цистеин	UGC UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC UUU
G	Gly	Глицин	GGA GGC GGG GGU
H	His	Гистидин	CAC CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA AUC AUU
K	Lys	Лизин	AAA AAG
L	Leu	Лейцин	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC AAU
P	Pro	Пролин	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA CAG
R	Arg	Аргинин	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Серин	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Треонин	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Валин	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC UAU

Подобная ситуация «ген внутри гена» известна и в ряде других случаев. Частично перекрывающиеся кодирующие последовательности обнаружены в ДНК вируса млекопитающих SV40. У РНКового фага MS2 один из генов перекрывает два других и, следовательно, не перекрывается лишь один из фаговых генов:



При анализе одного из мобильных генетических элементов у бактерий — элемента *IS*5 — был обнаружен еще более яркий пример сверхкомпактной организации генетической информации. В этом случае одна из цепей молекулы ДНК содержит два перекрывающихся гена, а комплементарный им участок второй цепи образует третий ген. Следовательно, обе цепи значимы и несут информацию, соответствующую трем генам:

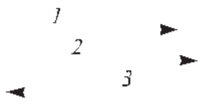


Таблица 6.4. Частота использования разных кодонов, кодирующих лейцин и аланин, у дрозофилы [Ashburner, 1989. P. 75]

Аминокислота	Кодон	Число случаев
Лейцин	CUU	610
	CUC	1096
	CUA	538
	CUG	3425
Аланин	GCC	3534
	GCA	926
	GCU	1397
	GCG	1159

По результатам выполнения «Геномного проекта *E. coli»* (см. разд. 6.5) обнаружено, что у 405 пар смежных генов вообще нет межгенных интервалов: знак начала трансляции одного гена частично перекрывается с конечным знаком другого, например:

начало начало
TGATG TAATG
конец конец

начало начало
ATGA GTGA
конец конец

3. Генетический код является вырожденным, в том смысле что одной аминокислоте может соответствовать несколько кодонов (табл. 6.3).

Однако кодоны используются не с одинаковой частотой. Например, у дрозофилы в результате параллельного изучения последовательностей кодонов в генах (269 тпн) и аминокислот, кодируемых ими, было показано, что кодоны используются с разной частотой (табл. 6.4) [см. также: Blattner et al., 1997; Russell, 1998; Ратнер, 2002].

4. Генетический код универсален, в том смысле что определенному кодону соответствует определенная аминокислота. Например, AUG-кодон кодирует метионин у любого организма. Однако по мере расширения круга объектов молекулярной генетики стали накапливаться исключения, сделавшие код «квазиуниверсальным». Касается это прежде всего митохондриальных геномов (табл. 6.5).

Дополнение 6.8

В 1980 г. за выдающийся вклад в разработку методов экспериментальных манипуляций с ДНК Нобелевская премия по химии была присуждена П. Бергу (P. Berg), У. Гилберту (W. Gilbert) и Ф. Сэнгеру (F. Sanger).

Таблица 6.5. Отклонения от универсального генетического кода [Lewin, 1994. P. 217–219]

Геном	Организмы	Кодоны	Универсальное значение	Необычное значение
Митохондрии	Позвоночные, дрозофила, дрожжи, плесени, трипаносомы	UGA	Stop	Trp
	Сахаромицеты	CUU CUC CUA CUG	Leu	Thr
		CGG	Arg	Trp
	Позвоночные, дрозофила, сахаромицеты	AUA	Ile	Met
	Морская звезда	AAA	Lys	Asn
	Позвоночные	AGA AGG	Arg	Stop
	Морская звезда, дрозофила	AGA AGA*	Arg	Ser
	Аскарида, нематода	UUG	Leu	Start
		AUU	Ile	Start
	Нематода	AUA	Ile	Start
	Млекопитающие	AUU AUC AUA	Ile	Start
	Микоплазма	UGA	Stop	Trp
Ядро	Цилиаты	UAA UAG	Stop	Gln
	Гриб кандида цилиндрика	CUG	Leu	Ser

A* — модифицированный аденин.

Литература к разделу 6.4

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 231–233.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 285–295.

Инге-Вечтомов С. Г. Трансляция как способ существования живых систем, или в чем смысл «бессмысленных» кодонов // Соросовский образовательный журн. 1996. № 12. С. 2–10.

Ратнер В. А. Генетический код как система // Соросовский образовательный журн. 2000. № 3. С. 17–22.

Ратнер В. А. Хроника великого открытия: идеи и лица // Природа. 1998. № 11. С. 18–28.

Ратнер В. А. Что содержит полный геном *Escherichia coli*? // Соросовский образовательный журн. 2002.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratoty handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 75.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. 1997. Vol. 277. P. 1453–1462.

Crick F. H. C. The genetic code — yesterday, today, and tomorrow // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1966. Vol. 31. P. 3–9.

Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J. General nature of the genetic code for proteins // Nature. 1961. Vol. 192. P. 1227–1232.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 98–100, 217–219.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Melno Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 428.

6.5. ГЕНОМИКА — НАУКА О ГЕНОМАХ

Необходимо разграничить понятия геном и генотип. Генотип — это совокупность генов, имеющих фенотипическое проявление. Геном — это вся ДНК в гаплоидном наборе хромосом данного вида.

Раздел генетики, посвященный изучению целых геномов живых организмов, называют геномикой. Сведения о размерах геномов некоторых организмов представлены в табл. 6.6. В настоящее время разрабатываются многочисленные так называемые геномные проекты. Цель их заключается в выяснении последовательностей оснований во всех молекулах ДНК в клетках того или иного организма. Это программы «Геном человека», «Геном дрозофилы», «Геном дрожжей» — всего около 50.

В проекте «Геном человека» исследователи стремятся к достижению пяти основных целей:

1. Завершить составление детальной генетической карты, на которой были бы помечены гены, отстоящие друг от друга на расстоянии, не превышающем в среднем 2 млн оснований (2 мегабазы — сокращенно Мб, от англ. base — основание).

2. Составить физические карты ДНК каждой хромосомы (с разрешением 0,1 Мб).

3. Построить карту всего генома в виде охарактеризованных по отдельности клонов (5 тыс. оснований в клоне, 5 кб).

4. Завершить к 2004 г. полное секвенирование ДНК (определение последовательностей нуклеотидов).

5. Нанести на карту последовательностей нуклеотидов все гены человека.

Более глубокие задачи поставлены исследователями, работающими в рамках программы «Геном дрозофилы»:

1. Закончить секвенирование всего генома (данные об эухроматиновой части опубликованы в марте 2000 г.).

2. Завершить секвенирование всех клонов кДНК, что позволит определить число и характеристики всех белков, синтезируемых в клетках дрозофилы.

3. Получить коллекцию инсерций *P*-элементов во все гены дрозофилы. Ожидается получить около 20 000 линий дрозофилы, что позволит узнать мутантные фенотипы всех генов.

4. Определить «расписание» экспрессии всех генов во всех тканях, на всех этапах онтогенеза и в разных условиях окружающей среды.

5. Создать набор модельных культур клеток из различных тканей дрозофилы, в которых можно изучать мутации с помощью биохимических методов.

6. Определить последовательности нуклеотидов у *Drosophila virilis*. Эти знания будут незаменимыми при интерпретации сведений

Таблица 6.6. Размеры геномов некоторых организмов [Сингер, Берг, 1998. С. 5]

Организм	Примерный размер гаплоидного генома, пн	Гаплоидное число хромосом
Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	$1,35 \times 10^7$	16
Миксомицеты (*Dictyostelium discoides*)	7×10^7	7
Трипаносома (*Trypanosoma brucei*)	8×10^7	Неизвестно
Нематода (*Caenorhabditis elegans*)	8×10^7	11/12
Шелкопряд (*Bombyx mori*)	5×10^8	28
Плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*)	$1,65 \times 10^8$	4
Морской еж (*Strongylocentrotus purpuratus*)	8×10^8	21
Шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*)	3×10^9	18
Протей (*Necturus maculosis*)	5×10^{10}	19
Курица (*Gallus domesticus*)	$1,2 \times 10^9$	39
Мышь (*Mus musculus*)	3×10^9	20
Корова (*Bovis domesticus*)	$3,1 \times 10^9$	60
Человек (*Homo sapiens*)	$2,9 \times 10^9$	23
Кукуруза (*Zea mays*)	5×10^9	10
Лук (*Allium cepa*)	$1,5 \times 10^{10}$	8
Арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*)	7×10^7	5

о *Drosophila melanogaster*: те функции и структуры *D. melanogaster*, которые сохранятся у *D. virilis*, являются консервативными и, по-видимому, важны.

Для выполнения работ по геномным проектам используют современные методы генной инженерии, компьютерные технологии обработки данных и объемные базы данных.

Первой крупной удачей геномных проектов было секвенирование генома бактерии *Hemophilus influenzae в* 1995 г. В 1996 г. был секвенирован геном *Saccharomyces cerevisiae* (12,5 Мб, около 6 тыс. генов), к середине декабря 1998 г. — геном нематоды *Caenorhabditis elegans* (97 Мб и 19 тыс. генов).

К настоящему времени составлены карты геномов 18 видов микроорганизмов, имеющих размеры геномов от 1 до 20 Мб (архебактерии, спирохеты, хламидобактерии, кишечная палочка, возбудители пневмоний, сифилиса, метанообразующие бактерии, микоплазмы, риккетсии, цианобактерии).

Из эукариот просеквенированы геномы дрожжей *S. cerevisiae,* нематоды *C. elegans* и дрозофилы.

Каким образом используют данные геномных проектов? Среди прочего можно упомянуть анализ генов, мутации которых приводят к болезням человека. Так, исследование генов *MEC1* и *TEL1* у дрожжей привело к пониманию функции гена *ATM* человека. Мутации этого гена приводят к болезни атаксии-телеангиэктазии. Примеров такого анализа к февралю 1996 г. уже было известно около 50 [Bassett et al., 1996].

Литература к разделу 6.5

Ратнер В. А. Что содержит полный геном *Escherichia coli*? // Соросовский образовательный журн. 2002.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2 т. Т. 2. М.: Мир, 1998. С. 5.

Сойфер В. Н. Международный проект «Геном человека» // Соросовский образовательный журн. 1998. № 12. С. 4–11.

Сойфер В. Н. Исследования геномов к концу 1999 года // Соросовский образовательный журн. 2000. № 6. С. 15–22.

Adams M., Celniker S., Holt R. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. Vol. 287. P. 2185–2223.

Ashburner M., Misra S., Roote J. et al. An exploration of the sequence of a 2.9 megabase region of the genome of *Drosophila melanogaster* — the «*Adh*» region // Genetics. 1999. Vol. 153. P. 179–219.

Bassett D. E. Jr., Boguski M. S., Hieter P. Yeast genes and human disease // Nature. 1996. Vol. 379. P. 589–590.

Bevan M., Murphy G. The small, the large and the wild. The value of comparison in plant genomics // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15. P. 211–214.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. 1997. Vol. 277. P. 1453–1462.

Clark M. S. Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project // BioEssays. 1999. Vol. 21. P. 121–130.

Clayton R. A., White O., Ketchum K. A., Venter J. C. The first genome from third domain of life // Nature. 1997. Vol. 387. P. 459–462.

Goffeau A. et al. Life with 6000 genes // Science. 1996. Vol. 274. P. 563–567.

Mark M. E. Big mouth // The New Yorker. 2000. June 12. P. 79–83.

Preston R. The genome warrior // Ibid. P. 66–77.

Rubin G. M. The *Drosophila* genome project: a progress report // Trends in Geneics. 1998. Vol. 14. P. 340–342.

Wilson R. K. How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15. P. 51–58.

Дополнение 6.9

Выполнение программ по расшифровке геномов требует огромных финансовых затрат и скоординированных усилий большого числа ученых из всех развитых стран мира. Например, для того, чтобы расшифровать последовательность нуклеотидов в геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, потребовались усилия более чем 600 ученых из 96 лабораторий мира [Clayton et al., 1997].

В 1990 г. на изучение геномов было потрачено 60 млн долларов, в 1991 г. — 135 млн, в 1992–1995 гг. ежегодно выделялось от 165 до 187 млн, а в 1996–1998 гг. только США расходовали 200, 225 и 253 млн долларов ежегодно.

В ведущих странах Запада началась настоящая гонка по увеличению финансирования исследований геномов. 3 мая 1999 г. в Великобритании добавили 167 млн долларов на исследования генома человека. 14 мая 1999 г. французское правительство добавило 330 млн долларов (на три года), в конце этого же года Германия стала отпускать на исследования геномов по 280 млн долларов ежегодно. В июле 1999 г. об увеличении финансирования геномных исследований объявила Япония. В ближайшие 5 лет на эти цели будет израсходовано 17 млрд долларов.

Россия, участвовавшая в начале создания международного проекта «Геном человека», фактически приостановила свой вклад в него [Сойфер, 1998, 2000].

6.6. СТРУКТУРА ГЕНОМА ЭУКАРИОТ

Главной особенностью генетического материала эукариот в сравнении с прокариотами является наличие избыточной ДНК.

По результатам экспериментов в рамках геномного проекта *E. coli* из 4 639 221 пн, входящих в состав генома этого вида, 87,8 % занимают реальные и вероятные белок-кодирующие гены, или цистроны, 0,8 % — гены, кодирующие различные фракции РНК, не связанные с кодированием белков (тРНК, рРНК и др.), 0,7 % — некодирующие повторы. Таким образом, геном *E. coli* на 88,6 % занят генами, а межгенные участки составляют относительно малую долю (около 11 %). Средний размер 4288 выявленных промежутков — 118 пн. Однако и межгенные интервалы очень часто содержат различные функциональные сайты, т. е. выполняют регуляторные функции [Blattner et al., 1997; Ратнер, 2002].

Иная картина наблюдается у эукариотических организмов. Например, у человека насчитывают приблизительно 5–10 × 10^4 генов [Алиханян и др., 1985]. В то же время размер генома человека около 3 × 10^9 пн. Это означает, что кодирующая часть генома составляет всего 10–15 % от всей ДНК. Однако это расчеты. А по результатам выполнения проекта «Геном человека», опубликованным 13 февраля 2001 г., только 1 % генома приходится на кодирующие экзоны, 24 % на некодирующие интроны и 75 % на межгенные промежутки. Другими словами, у человека только 1 % ДНК генома кодирует информацию о синтезе белков [Venter et al., 2001]. У ресничных инфузорий межгенные промежутки в ДНК микронуклеуса составляют около 95 % [Prescott, 2000]. Существуют виды, геном которых в десятки раз больше генома человека, например некоторые рыбы, хвостатые амфибии, лилейные растения. Избыточная ДНК характерна для всех эукариот.

В конце 60-х гг. американские ученые Р. Бриттен и Э. Дэвидсон открыли фундамен-

Таблица 6.7. Данные о числе генов у разных модельных объектов, полученные на основе расчетов или в результате определения последовательности нуклеотидов

Таксон	Вид	Число генов по данным авторам		
		Lewin, 1994	Miklos, Rubin, 1996	Другие
Prokaryota	*Mycoplasma genitalium*		473	470[7]
	Haemophilus influenzae		1 760	1 743[7]
	Bacillus subtilis	2 350	3 700	4 100[7]
	Escherichia coli		4 100	4 909[5], 4 288[7]
	Myxococcus xanthus		8 000	
Fungi	*Saccharomyces cerevisiae*	5 200	5 800	6 200[4], 6 034[7]
Infusoria	*Cyanidioschyzon merolal*		5 000	
	Oxytriha similis		12 000	
Arthropoda	*Drosophila melanogaster*	8 000	12 000	8 000–20 000[2] 20 000–30 000[3] 12 000[7]
Nematoda	*Caenorhabditis elegans*		14 000	~ 19 099
Mollusca	*Loligo peali*		> 35 000	
Chordata			70 000	
	Fugu rubripes		70 000	
	Mus musculus	125 000	70 000	50 000[1]–120 000[6]
	Homo sapiens			100 000[7], 27 000[8]
Plantae	*Nicotiana tabacum*		43 000	
	Arabidopsis thaliana		16 000–33 000	

[1]Алиханян и др., 1985; [2]Nüsslein-Volhard, 1994. — Из: Zhimulev, 1999; [3]Zhimulev, Belyaeva, 1974. — Из: Zhimulev, 1999; [4]Clayton et al., 1997; [5]Blattner et al., 1997; [6]Сойфер, 2000; [7]Lewin, 1994; [8]Venter et al., 2001.

тальную особенность молекулярной структуры генома эукариот — наличие последовательностей нуклеотидов разной степени повторяемости. Это открытие было сделано с помощью молекулярно-биологического метода изучения кинетики ренатурации денатурированной ДНК. Различают следующие фракции в геноме эукариот:

1. Уникальные последовательности, т. е. представленные в одном экземпляре.

2. Промежуточные (или среднечастотные) повторы. Это последовательности, повторяющиеся десятки и сотни раз.

3. Высокочастотные повторы, число которых в геноме достигает 10^6 копий.

Уникальные последовательности чаще всего представлены генами. Число генов у эукариот определяют одним из двух способов. Первый способ прямой, т. е. экспериментально определяют последовательности нуклеотидов во всем геноме, число последовательностей, содержащих длинные рамки считывания. Понятно, что такой анализ можно провести пока на очень ограниченном числе видов, главным образом тех, которые вовлечены в геномные проекты.

Другой подход используют уже 20–30 лет. С помощью довольно простых процедур рассчитывают возможное число генов у того или иного вида. Сначала определяют общий размер генома этого вида, затем, зная средний размер гена у этого вида и добавив к этому значению половину размера собственно гена (межгенный промежуток), делят значение размера генома на значение размера гена с межгенным промежутком и получают число генов. Все эти оценки в какой-то степени субъективны, поэтому варьируют в довольно широких пределах (табл. 6.7).

Повторы образуют семейства — совокупность последовательностей, полностью или по большей части гомологичных друг другу.

Нередко из-за существенных различий в нуклеотидном составе высокочастотных повторов и основной ДНК первые образуют при центрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия так называемые сателлитные пики, которые имеют большую или меньшую плавучую плотность, чем остальная ДНК (см. разд. 9.5.9). Эта фракция генома представлена небольшим (10–15) числом семейств коротких (5–12 пн) повторов, образующих протяженные блоки. У большинства видов эта фракция занимает не более 10 % генома. Близкие виды, например мышь и крыса, имеют совершенно различные высокочастотные последовательности: у крысы их нуклеотидный состав не отличается от основной ДНК, тогда как геном мыши содержит четкий АТ-богатый сателлит. Это означает, что высокочастотные повторы способны к быстрым изменениям в ходе видообразования.

Остальные 90 % генома эукариот построены по принципу чередования (интерсперсии) уникальных и повторяющихся последовательностей. Условно выделяют два основных типа интерсперсии, получивших названия по тем видам, у которых они впервые были описаны: интерсперсия типа «ксенопус» (обнаружена у *Xenopus laevis*) и типа «дрозофила» (впервые описана у *D. melanogaster*).

Примерно в 50 % генома *Xenopus laevis* (рис. 6.20) уникальные последовательности из примерно 1500 пн чередуются с повторяющимися, средний размер которых 300 пн. В остальной части геномов типа «ксенопус» расстояния между соседними повторами значительно превышают 1–2 тпн.

Структура генома типа «ксенопус» широко распространена, особенно среди животных. Млекопитающие и человек также относятся к этому типу организации генома. Особенность генома человека и других приматов составляют интерсперсные высокочастотные повторы длиной около 300 пн. У человека эти повторы содержат сайт, разрезаемый ферментом рестрикции *Alu* I. Число таких повторов достигает $5 \times 10^5 - 10^6$ копий.

Дрозофила по параметрам интерсперсии резко отличается от видов, имеющих геном типа «ксенопус». Повторяющиеся последовательности длиной 5600 пн чередуются с уни-

Рисунок 6.20

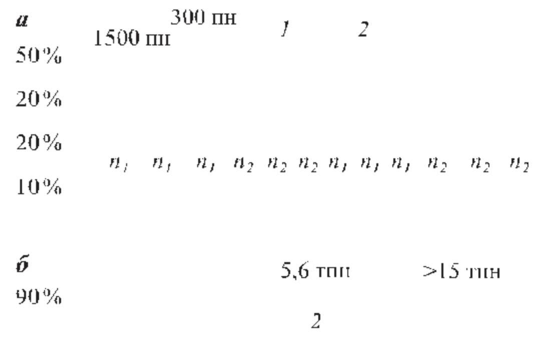


Схема чередования последовательностей нуклеотидов разной степени повторяемости в геномах типа *Xenopus* (*а*) и типа *Drosophila* (*б*) [Алиханян и др., 1985. С. 106].

1 — уникальная последовательность, *2* — диспергированная повторяющаяся последовательность; n_1 и n_2 — короткие повторы. Слева указаны доли генома (%) с данным типом чередования последовательностей

кальными, длина которых не менее 13 000 пн (см. рис. 6.20). Интересно отметить, что у *Musca domestica* — вида, близкого *D. melanogaster*, геном устроен по типу «ксенопус». Этот факт прямо указывает на то, что в ходе эволюции возможны очень быстрые преобразования характера чередования последовательностей.

Птицы по параметрам интерсперсии занимают промежуточное положение между типом «ксенопус» и типом «дрозофила». Многие виды не могут быть отнесены ни к тому, ни к другому типу.

Литература к разделу 6.6

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 104–109.

Ратнер В. А. Что содержит полный геном *Escherichia coli*? // Соросовский образовательный журн. 2002.

Сойфер В. Н. Исследования геномов к концу 1999 года // Соросовский образовательный журн. 2000. № 6. С. 15–22.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. 1997. Vol. 277. P. 1453–1462.

Clayton R. A., White O., Ketchum K. A., Venter J. C. The first genome from third domain of life // Nature. 1997. Vol. 387. P. 459–462.

Dimitri P., Junakovic N. Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15, N 14. P. 123–124.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 660–673.

Miklos G. L. G., Rubin G.M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms // Cell. 1996. Vol. 86. P. 521–529.

Petrov D. A. Evolution of genome sige: new approaches to an old problem // Trends in Genetics. 2001. Vol. 17, N 1. P. 23–28.

Prescott D. M. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in Ciliates // Nature Rev. Genetics. 2000. Vol. 1. P. 191–198.

Venter J. C. et al. The sequence of the human genome // Science. 2001. Vol. 291. P. 1304.

Zhimulev I. F. Genetic organization of polytene chromosomes // Advances in Genetics. 1999. Vol. 39. P. 94–97.

6.7. МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА

6.7.1. Открытие и классификация мобильных элементов

В начале 40-х гг. американская исследовательница Б. МакКлинток (рис. 6.21) открыла существование гена, или локуса, который вызывал повышение частоты хромосомных перестроек у кукурузы. Среди потомков от скрещивания, в котором оба родителя несли такие перестройки, появлялись нестабильные мутации с неожиданно высокой частотой. В 1948 г. она опубликовала результаты исследований этого локуса, вызывающего разрывы хромосом, сделав вывод, что он является совершенно необычным, поскольку может перемещаться из одного участка хромосомы в другой. Б. МакКлинток назвала феномен перемещения транспозицией [см.: Federoff, 1994], а сами локусы — контролирующими элементами (КЭ). Эти элементы характеризуются следующими свойствами:

1) они могут перемещаться из одного сайта в другой;

2) их встраивание в данный район влияет на активность генов, расположенных рядом;

3) утрата КЭ в данном локусе превращает прежде мутабильный локус в стабильный;

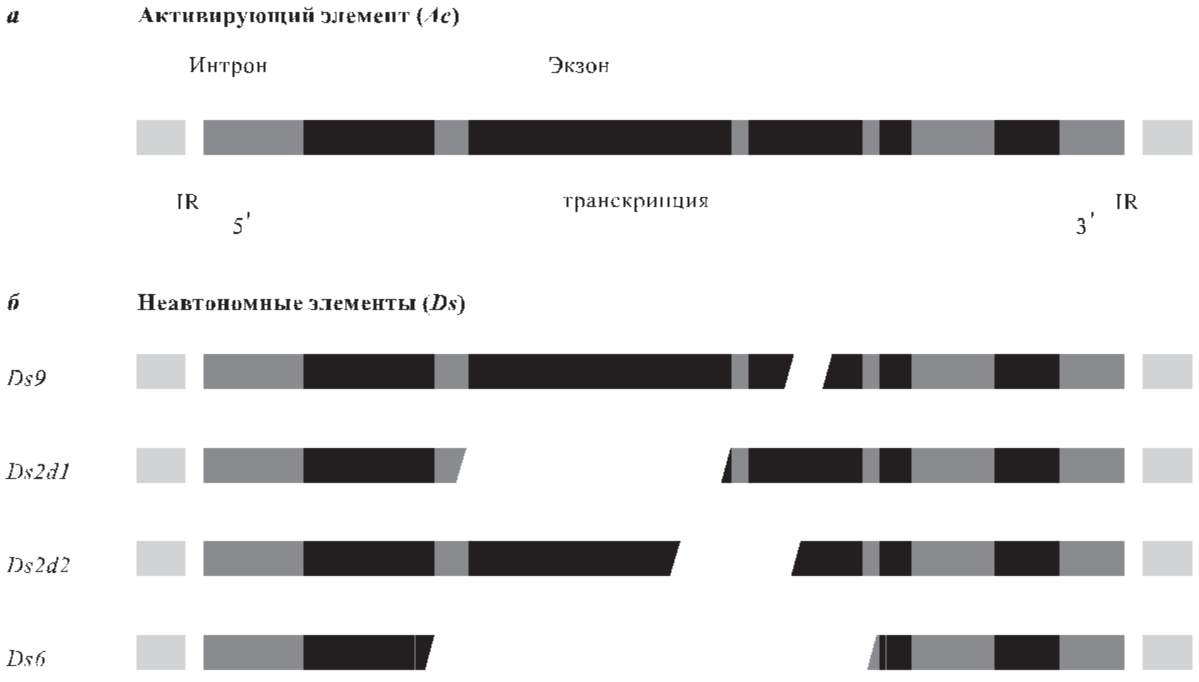
4) в сайтах, в которых присутствуют КЭ, могут возникать делеции, транслокации, транспозиции, инверсии, а также разрывы хромосом.

Геном кукурузы содержит несколько семейств КЭ. Члены каждого семейства могут быть подразделены на два класса:

Рисунок 6.21

Барбара МакКлинток (1902–1992)

Рисунок 6.22



Структура автономного *Ac*-элемента (*а*) и неавтономных *Ds*-элементов (*б*) у кукурузы [Russell, 1998. P. 669]

1. Автономные элементы, которые способны вырезаться и транспозироваться. Их внедрение ведет к появлению нестабильных аллелей.

2. Неавтономные элементы, которые могут быть активированы к транспозиции только определенными автономными элементами (членами того же семейства).

У кукурузы изучены лучше всего семейства *Ac–Ds*, *Spm* (супрессор-мутатор) и *Dt*.

При встраивании автономного элемента в ген последний мутирует, однако мутация эта будет нестабильной, так как элемент может выйти из данного гена и переместиться в другой участок генома. Поскольку частота транспозиции значительно выше, чем частота обратного спонтанного мутирования, то аллель, индуцированный автономным элементом, называется мутабильным.

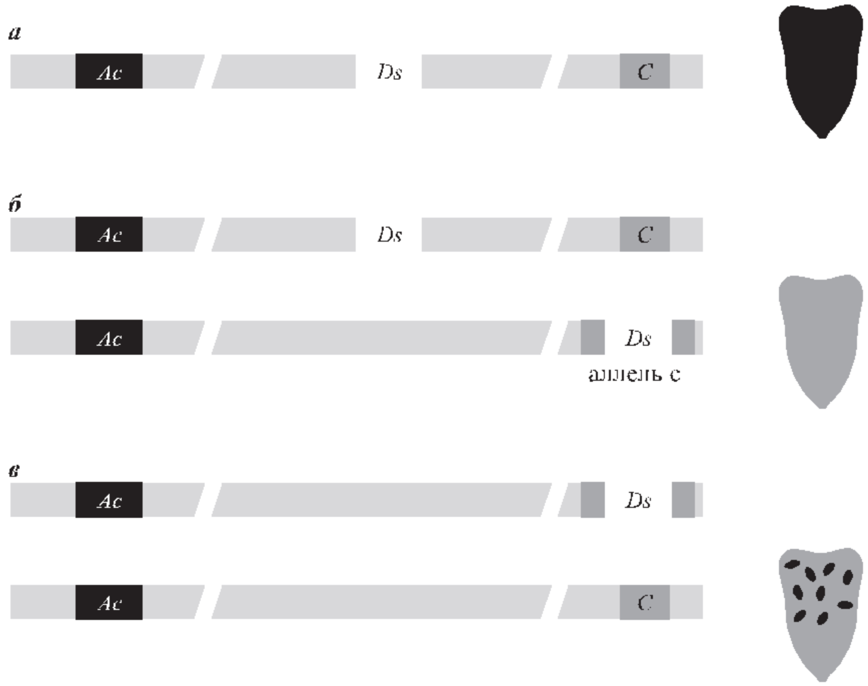
Система *Ac–Ds* у кукурузы была изучена в деталях. *Ac*-элемент имеет длину 4563 пн с инвертированными повторами (IR) на концах. Он содержит единственную единицу транскрипции (5 экзонов и 6 интронов), кодирующую фермент транспозазу. Элементы *Ds* возникают в результате делеций внутренних участков *Ac*-элемента (рис. 6.22).

Если растение имеет аллель гена *C* дикого типа, зерно будет иметь пурпурную окраску (рис. 6.23, *а*), если *Ac*-элемент индуцировал инсерцию *Ds* в ген *C*, возникает мутантный аллель *c*, и зерно будет желтым (см. рис. 6.23, *б*). В ходе развития *Ds*-элемент может в некоторых клетках выйти из гена *C*, в результате чего зерна вновь приобретут пурпурную окраску. Таким образом возникает мозаичность (*в*).

К настоящему времени мобильные элементы открыты у множества видов растений, животных и микроорганизмов.

По механизмам транспозиции мобильные элементы делятся на две большие группы (рис. 6.24). Элементы класса I перемещаются, используя обратную транскриптазу, т. е. на РНК-матрице мобильного элемента синтезируется ДНК. Обратная транскриптаза (ревертаза в русскоязычной литературе) не только ведет синтез нити ДНК на РНК , но и осуществляет синтез второй комплементарной нити ДНК, а РНК-матрица распадается и удаляется. Двунитевая ДНК синтезируется в цитоплазме, а затем перемещается в ядро и может встроиться в геном, образуя провирус. Такие мобильные элементы называют ретротранспозонами (или ретропозонами). Ретротранспозоны составляют как минимум 2 % генома у дрозофилы и более 40 % у некоторых растений. Элементы класса II перемещаются непосредственно как ДНКовые элементы и называются транспозонами.

Рисунок 6.23



Изменение окраски кукурузного зерна под влиянием перемещений элементов *Ac–Ds* [Russell, 1998. P. 668]

Механизм перемещений небольшой группы мобильных элементов, составляющих класс III, неизвестен.

На рис. 6.24, *в* показана структура ретровирусоподобных элементов, или ретротранспозонов (ретропозонов). Они очень похожи на ретровирусы, во-первых, потому, что обладают способностью встраивать (в форме провирусов) ДНК-копии своих РНК-геномов в хромосомы клеток-хозяев, во-вторых, ретропозоны имеют прямые длинные концевые повторы (LTR) на каждом конце. Есть потенциальный тРНК-праймер-связывающийся сайт (PBS) сразу после левого LTR и обогащенная пуринами последовательность непосредственно перед правым LTR. В-третьих, ДНК между LTR содержит открытые рамки считывания. Первая из них имеет гомологию с геном *gag* ретровирусов, который кодирует 3 белковых компонента нуклеопротеиновой сердцевины вириона. Вторая рамка напоминает вирусный ген *pol* и кодирует все белки, необходимые для транспозиции, включая протеазу (Pr), обратную транскриптазу (RT), РНК-азу Н и интегразу (Int). Ретротранспозоны считываются в полицистронную мРНК, которая затем транслируется в полипротеин. У некоторых мобильных элементов эти открытые рамки сливаются. Некоторые элементы имеют три рамки. Третья рамка занимает сходное положение с вирусными генами *env*, но имеет другую последовательность нуклеотидов. У ретровирусов ген *env* кодирует компоненты оболочки вирусной частицы. Элементы этого типа встречаются у дрозофилы (*copia-like*), у дрожжей (*Ty*), у грызунов (*IAP* и *VL30*), у человека (*THE*), у кукурузы (*BS1*).

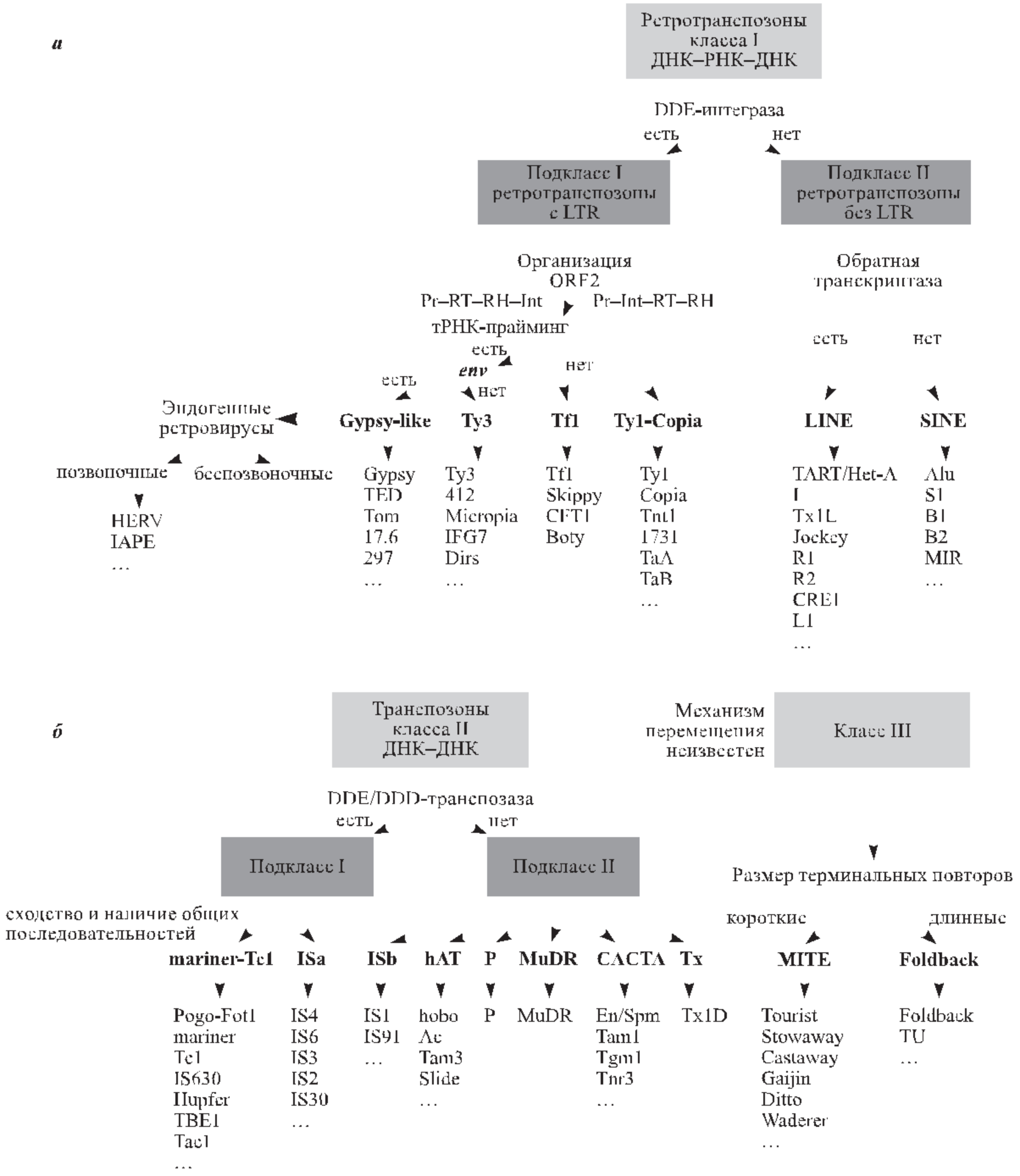
Участки длинных концевых повторов (LTR) включают все *цис*-регуляторные элементы, необходимые как для инициации транскрипции, так и для полиаденилирования РНК. LTR содержат три функциональных домена: U3, R и U5. Транскрипция начинается на 5'-конце домена R на 5'-LTR и доходит до 3'-конца домена R на 3'-LTR.

Элементы, не имеющие концевых повторов (невирусные ретропозоны), обычно имеют две открытые рамки считывания (см. рис. 6.24, *в*). Первая напоминает ген *gag*, а вторая кодирует потенциальную обратную транскриптазу (RT). У этих элементов есть последовательность, обогащенная аденином (A_n) на 3'-кон-

Дополнение 6.10

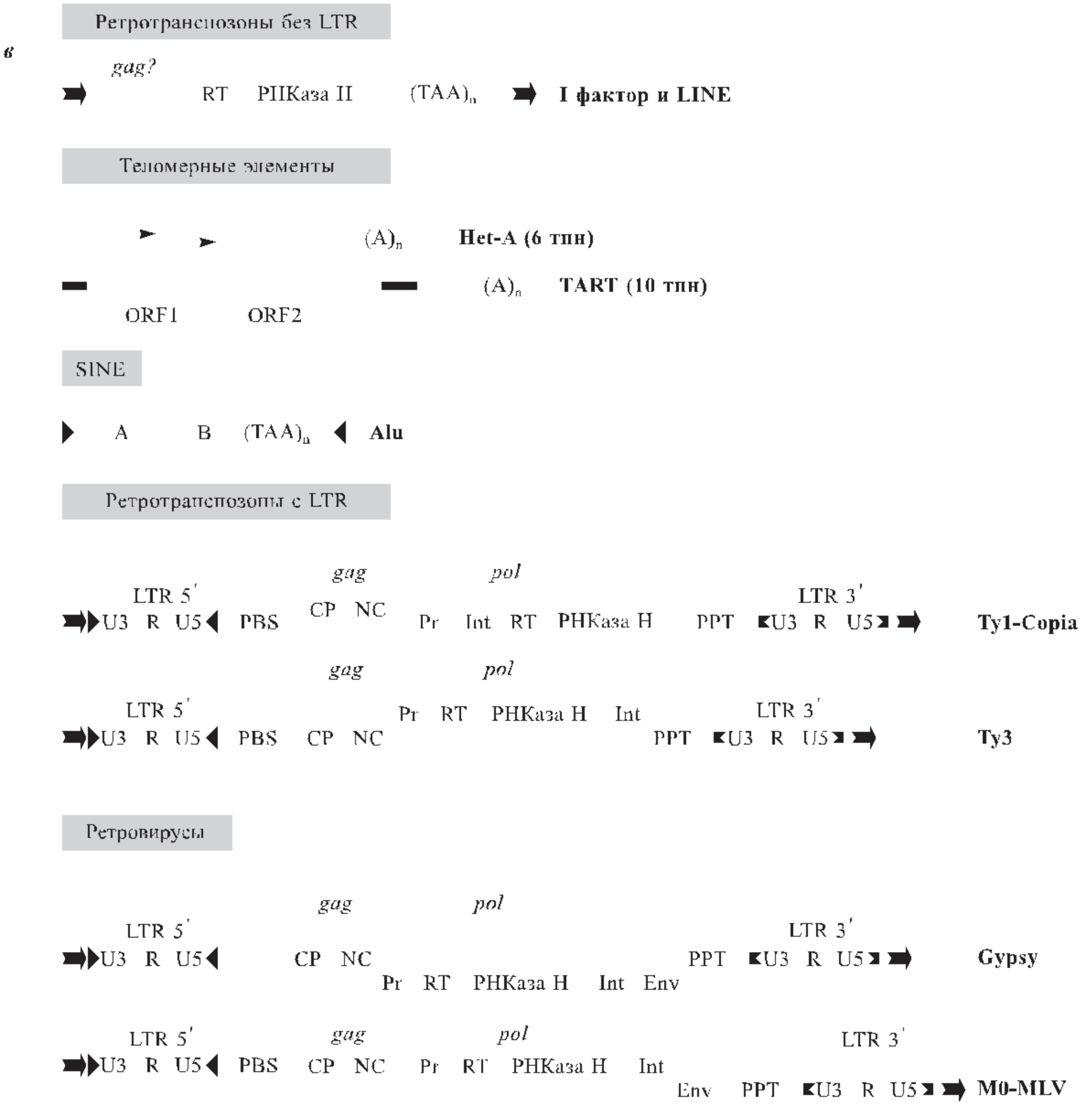
В 1983 г. за открытие мобильных генетических элементов Нобелевская премия была присуждена Барбаре МакКлинток (B. McClintock).

Рисунок 6.24



це одной из нитей (ее нет у *R1Bm*-элемента, встраивающегося в некоторые гены 28S РНК у *Bombix mori*). У них часто делетирован определенный участок с 5'-конца, но они имеют фиксированный 3'-конец. Транспозоны такого типа встречаются у млекопитающих (*L1*), у дрозофилы (*I*, *F*, *G*, *jockey*), у трипаносомы (*INGI/TRS1*), у кукурузы (*Cin4*), а также у *Ascaris lumbricoides*.

Второй класс элементов (см. рис. 6.24, *б*) объединяет представителей, которые перемещаются в геноме как ДНК-элементы. В этот класс входят транспозоны бактерий (*IS*-элементы), *P* и *hobo* у дрозофилы, *Ac*/*Ds* и *Spm*/*En* у кукурузы, *Tam* у *Antirrhinum majus* и *Tc1* у нематоды *C. elegans*. Все они имеют короткие инвертированные повторы на концах. *P*, *Ac* и *Spm*/*En* кодируют по крайней мере



Классификация и структура мобильных элементов [Capy et al., 1998. P. 17, 41]:
а — классификация ретротранспозонов (класс I); *б* — классификация транспозонов (класс II) и мобильных элементов класса III; *в* — структура ретротранспозонов и ретровирусов.
LTR — длинные концевые повторы; RT — обратная транскриптаза; RH, РНКаза H — рибонуклеаза H; Int — интеграза; Pr — протеаза; ORF — открытая рамка считывания

одну функцию — транспозазы, поскольку элементы с внутренними делециями могут перемещаться только в присутствии полных элементов.

Элементы с длинными концевыми инвертированными повторами составляют класс III. Это *fold-back* (или *FB)* элементы у дрозофилы, *TU* у морского ежа. О механизмах их перемещений известно мало.

6.7.2. Мобильные элементы у дрозофилы

Скрещивания определенных линий дрозофилы приводит к образованию потомства с «дисгенетическими признаками». Это выражается в появлении у них серии генетических дефектов, таких как мутации, хромосомные аберрации, нарушение расхождения хромосом в мейозе и стерильность. Комплекс этих гене-

Рисунок 6.25

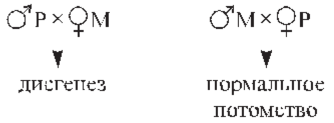


Схема скрещиваний при гибридном дисгенезе.

Гибридный дисгенез асимметричен. Он проявляется только в одном из реципрокных скрещиваний

тических аномалий характеризует явление, получившее название гибридного дисгенеза.

У дрозофилы было выделено несколько систем, обусловливающих гибридный дисгенез: например, I–R, P–M. При скрещиваниях самцов из линий I (inducer) с самками R (reactive) наблюдается уменьшение плодовитости потомства, однако реципрокное скрещивание такого эффекта не дает.

Скрещивание между самцом P (paternal) и самкой M (maternal) вызывает дисгенез, а реципрокное скрещивание — нет (рис. 6.25).

Дисгенез проявляется преимущественно в зародышевых клетках. Морфологический дефект в развитии зиготы обнаруживается со стадии, на которой в зародышевой линии начинается быстрое клеточное деление. Дисгенез вызывается фактором *P*, находящимся в хромосомах P-линии, в линии M нет *P*-фактора. Показано, что *P*-фактор активируется под действием M-цитоплазмы, унаследованной по материнской линии. Материнская M-цитоплазма названа M-цитотипом. Внедрения *P*-элемента стабильны, если хромосома находится в P-цитотипе; если хромосома попадает в M-цитотип, *P*-элементы начинают перемещаться.

Любая хромосома P-самца может вызвать гибридный дисгенез в скрещиваниях с M-самкой. В пределах же одной хромосомы довольно много районов способно вызвать дисгенез. Это предполагает, что P-самец в своем геноме имеет большое число *P*-факторов — от 30 до 50, и в разных линиях локализация их различна.

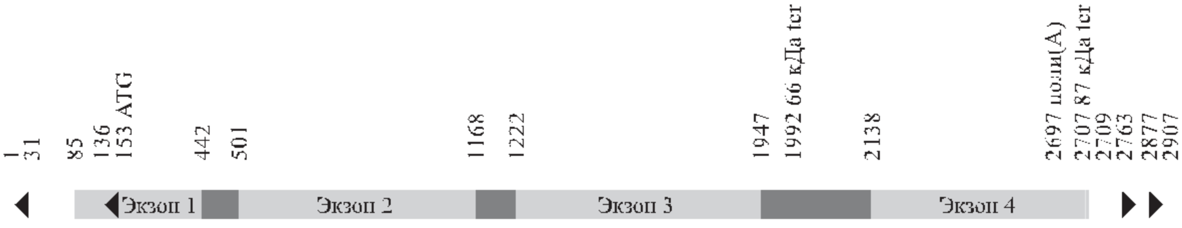
ДНК *P*-элемента выделена и охарактеризована (рис. 6.26). Он имеет длину 2907 пн и ограничен терминальными повторами размером 31 пн. Функционально это один ген, дающий транскрипт размером 2,7 тпн, кодирующий белок с молекулярной массой 87 кДа — транспозазу. В половых клетках все три интрона процессируются. В соматических клетках синтезируется белок размером 66 кДа, связывающийся с третьим экзоном, что препятствует сплайсингу последнего интрона и приводит к репрессии перемещений транспозона. Эти различия в экспрессии транспозазы определяют специфичность активирования перемещений *P*-элемента в половых клетках.

Для осуществления транспозиции *P*-элемента необходимо примерно 150 пн на терминальных концах элемента. Транспозаза связывается с последовательностью длиной 10 пн, расположенной рядом с инвертированным повтором 31 пн (см. рис. 6.26). Транспозиция происходит по принципу «вырезание — встраивание».

Эффект цитотипа при гибридном дисгенезе у дрозофилы объясняется моделью, представленной на рис. 6.27. Белок 66 кДа, который репрессирует транспозицию, в большом количестве присутствует в яйце, как материнский фактор. В линии P должно быть достаточно этого белка, чтобы полностью предотвратить транспозицию, хотя *P*-элементы и присутствуют. В любом скрещивании, в котором принимает участие P-самка, транспозаза не синтезируется. В том случае, когда самка имеет M-цитотип, в яйце не накапливается белок-репрессор и внесение *P*-элемента из генома самца приводит к наработке транспозазы в клетках зародышевого пути.

Интересно, что линии *D. melanogaster*, выделенные из диких популяций более 30 лет назад, всегда имеют M-цитотип. В последние

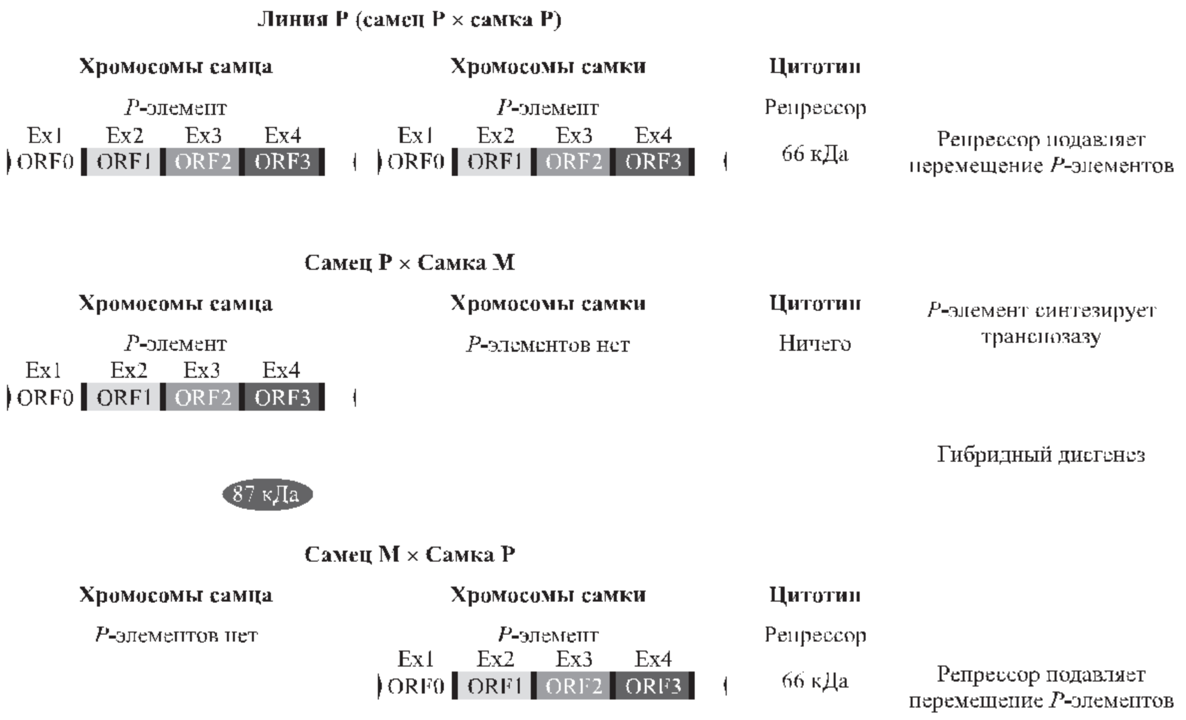
Рисунок 6.26



Структура и организация транскрипции *P*-элемента у *D. melanogaster* [Ashburner, 1989. P. 988].

Показаны 4 экзона. Белыми стрелками указаны дупликации хозяйской ДНК в месте встройки (8 пн), черными — терминальный (31 пн) и внутренний (11 пн) инвертированные повторы

Рисунок 6.27



Модель гибридного дисгенеза, основанная на взаимодействии между *P*-элементом в геноме и репрессорным белком 66 кДа в цитотипе [Lewin, 2000. P. 481]

Рисунок 6.28

Георгий Павлович Георгиев
(р. 1933)

Рисунок 6.29

Дэвид Хогнесс
(р. 1925)

10 лет почти все дикие популяции имеют *P*-элементы. Полагают, что повсеместное распространение *P*-элемента связано с инвазией и что источником его являются какие-то другие виды.

Кроме *P*-элемента у дрозофилы известно множество других мобильных элементов. Впервые они были выделены и охарактеризованы в лабораториях Г. П. Георгиева (рис. 6.28) и В. А. Гвоздева в России, а также Д. Хогнесса (рис. 6.29) в США в 1975–1976 гг. Около 12 % генома дрозофилы приходится на умеренные повторы, примерно четверть от этого количества занято умеренно повторенными генами (рРНК, тРНК, гистоны). Остающиеся 15 000 тпн (9 % генома) организованы примерно в 50 семейств мобильных элементов [Ashburner, 1989. P. 91–97]. Мобильные элементы часто получают названия, отражающие их способность к перемещению: Магеллан, Бигль, *hobo* — бродяга, *gypsy* — цыган, *flea* — блоха, *burdock* — репейник, *jockey* — наездник и т. д. Они отличаются друг от друга по следующим характеристикам:

1) по размерам: средние размеры — 5 тпн, причем самый маленький — «элемент 1360» — 1,176 тпн, самый большой — «17.6» — 7,4 тпн;

2) по числу копий: от 1 до 120 на геном;

3) по наличию и размерам длинных концевых повторов: они могут иметь длину 270–840 пн, быть прямыми или обратными;

4) по индукции дупликаций ДНК-хозяина в сайте встраивания — 4–8 пн.

6.7.3. *Ty-элементы у дрожжей*

Транспозон *Ty* (рис. 6.30) ограничен на концах длинными концевыми повторами — дельта (δ). Элементы дельта на 70 % состоят из АТ-последовательностей. Каждый из них имеет промотор и последовательность, опознаваемую ферментами транспозиции. *Ty*-элемент имеет длину 5,9 тпн и кодирует единственную мРНК длиной 5700 нуклеотидов, старт транскрипции которой находится в промоторе элемента дельта. Матричная РНК имеет открытые рамки считывания, т. е. рамки, начинающиеся со стартового кодона и кончающиеся терминирующим кодоном. Эти две рамки называют *TyA*, *TyB*.

Генетических маркеров у этого транспозона нет, поэтому следить за его перемещениями трудно.

Ty имеет много черт сходства с ретровирусами: в частности, транспозиции у них происходят, как у ретротранспозонов, и уже установлено, что *Ty*-элемент кодирует обратную транскриптазу.

Рисунок 6.30

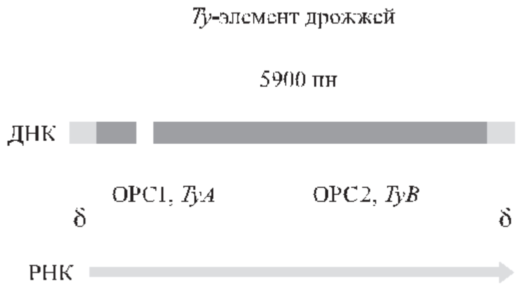


Схема организации *Ty*-элемента у дрожжей [Russell, 1998. P. 671].

ОРС1 и ОРС2 — открытые рамки считывания; светлый промежуток в ОРС1 — энхансерный элемент

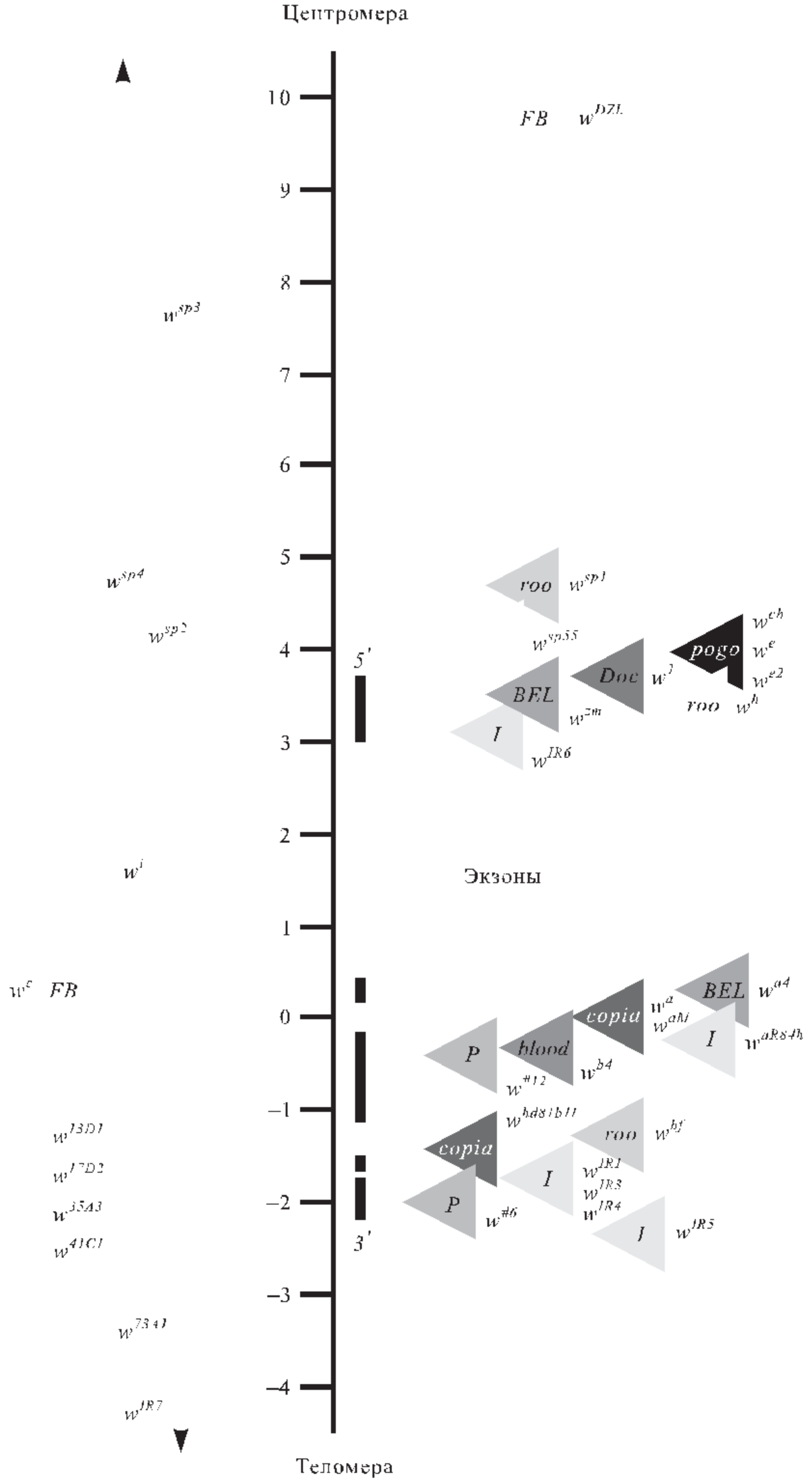
6.7.4. *Транспозоны млекопитающих*

У млекопитающих в составе генома обнаружено несколько классов умеренно повторенных последовательностей: SINE (short interspersed nuclear elements) и LINE (long interspersed nuclear elements). Элементы SINE — это фрагменты длиной 100–300 пн, чередующиеся с уникальными последовательностями от 1000 до 2000 пн. Элементы LINE имеют длину более 5 тпн, они чередуются с уникальными последовательностями до 35 тпн длиной. Как SINE, так и LINE представлены семействами, состоящими из одинаковых элементов.

В геноме человека SINE широко представлены семейством элементов *Alu*. Члены этого семейства имеют длину 300 пн и повторены в геноме от 300 000 до 500 000 раз. Около 3 % генома человека приходится на долю этих повторов. Наименование *Alu* этот элемент получил, поскольку содержит сайт узнавания рестриктазы *Alu*I. Каждая *Alu*-последовательность фланкирована прямыми повторами длиной от 7 до 20 пн. По этой причине полагают, что *Alu*-повторы являются мобильными элементами, скорее всего ретротранспозонами.

Одно из семейств, принадлежащих LINE, это LINE-1 (или *L1*-элемент). Полагают, что в геноме человека присутствует 50–100 тыс. копий *L1*, т. е. он представляет около 5 % генома. Максимальная длина этих элементов составляет 6500 пн, хотя именно таких элементов в геноме не более 3500. Остальные же копии по аналогии с *Ds*-элементами кукурузы имеют внутренние делеции различной длины. Полноразмерные *L1*-элементы содержат большие открытые рамки считывания, имеющие гомологию с известными обратными транскриптазами.

Рисунок 6.31



Молекулярная карта гена *white* у дрозофилы [Lindsley, Zimm, 1992. P. 773].

Участок, на котором выявляются дефекты ДНК (физическая карта), приводящие к мутантному фенотипу *w*, изображен вертикальной линией, маркированной цифрами от 10 до –4. Правее показаны экзоны гена от 5' до 3' и позиции встроек различных мобильных элементов (изображены треугольником, внутри которого наименование элемента, рядом – название мутации). Слева от физической карты ДНК показана протяженность делеций ДНК (сплошная линия) и дупликации (прерывистая)

6.7.5. Функциональное значение мобильных элементов

Наличие мобильных элементов в геномах имеет разнообразные генетические последствия.

1. Перемещения и внедрение мобильных элементов в гены может вызывать мутации.

Так, большинство «спонтанных» мутаций в локусе *white* у дрозофилы индуцированы инсерциями мобильных генетических элементов (рис. 6.31). Около 80 % спонтанных мутаций, изученных в разных локусах дрозофилы, вызвано инсерциями мобильных элементов. Внедряясь в ген, мобильный элемент может повредить экзон, разорвав его. В таком случае ген будет лишен возможности кодировать белок. Попадая в район промоторов или энхансеров, мобильный элемент может повредить регуляторную зону гена. Наконец, инсерция в район интрона может оказаться безвредной, поскольку вся последовательность интрона вместе с мобильным элементом будет вырезана во время процессинга мРНК, а соседние экзоны беспрепятственно сплайсируются. В случае встраивания мобильных элементов в участки интронов, контролирующих процесс сплайсинга, может произойти мутация.

Синтезированы экспериментальные схемы, позволяющие получать большое число мутаций у дрозофилы, индуцируемых мобильными *P*-элементами, причем инсерция присутствует у мутантов в единственном экземпляре. Получают гетерозиготу по двум *P*-элементам:

$$P[ry^{+}\Delta 2\text{–}3](99B) \quad \text{и} \quad P[lArB]$$

Элемент $P[ry^{+}\Delta 2\text{–}3]$ (99B) имеет два полезных свойства: он синтезирует транспозазу, которая может катализировать транспозицию неавтономного *P*-элемента, но не может перемещаться сам. Элемент *P*[*lArB*] способен перемещаться, но не имеет своей транспозазы. Конструкция *P*[*lArB*] содержит гены $rosy^{+}$ и Adh^{+}, которые облегчают обнаружение инсерций конструкции на фоне мутаций *ry* и *Adh*. Этот метод получил название «jump-start».

Ставится следующее скрещивание (рис. 6.32). Самок, содержащих конструкцию *P*[*lArB*], встроенную в хромосому, маркированную доминантной мутацией *CyO*, и гомозиготных по мутации $rosy^{506}$, скрещивают с самцами, у которых имеется по одной доминантной мутации (*Sp* и *CyO*) во второй хромосоме и инсерция транспозона $P[ry^{+}\Delta 2\text{–}3]$ в третью хромосому, меченную мутацией *Sb*. В потомстве отбирают самцов $rosy^{+}/Sb$, *CyO*/*Sp*. Они имеют инсерции транспозонов обоих типов. Это самцы jump-start. Их скрещивают с самками ry^{506}/ry^{506}. В потомстве отбирают самцов CyO^{+} (т. е. без *P*[*lArB*] в исходной хромосоме), Sb^{+} (т. е. без $P[ry^{+}\Delta 2\text{–}3]$), но $rosy^{+}$ (т. е. содержащих *P*[*lArB*] в новой позиции во второй или третьей хромосоме).

2. Изменение состояния активности генов.

Длинные концевые повторы являются промоторами ретротранспозона, причем как LTR, так и сам ретротранспозон содержат нуклеотидные последовательности, являющиеся энхансерами транскрипции. Поэтому перемещение этих сигналов в геноме может изменять регуляцию активности генов. Например, если мобильный элемент оказался около протоонкогена, то результатом может быть сверхпродукция белка и злокачественное перерождение клетки (см. гл. 17).

Рисунок 6.32

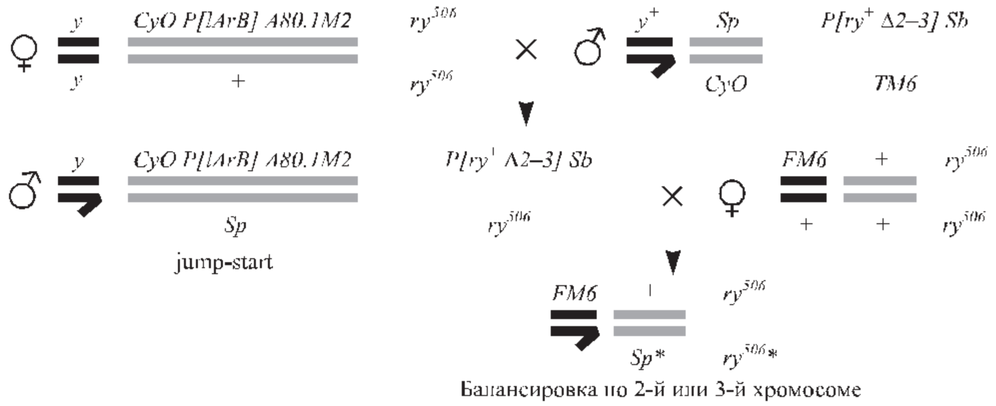
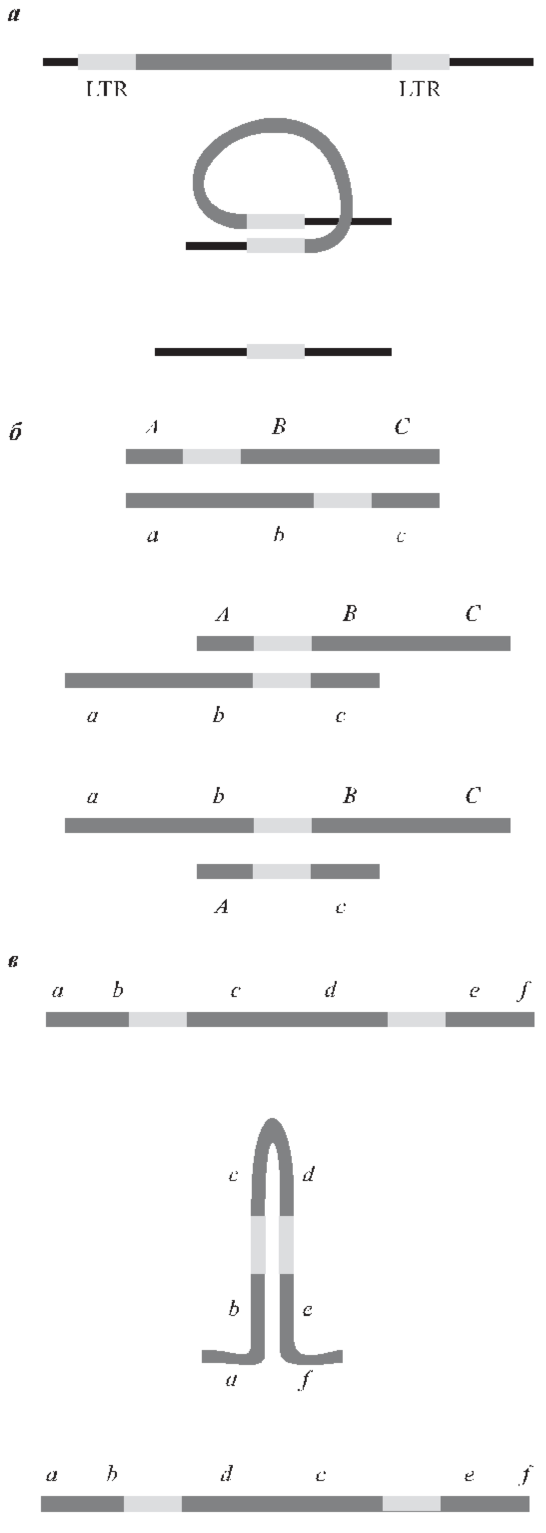


Схема скрещиваний, позволяющих получить мутации в аутосомах, индуцированные перемещениями *P*-элемента.

Звездочкой помечены хромосомы, в которые мог внедриться транспозон

Рисунок 6.33



Возникновение подвижного промотора из-за кроссинговера между двумя LTR (*а*), делеции и дупликации из-за кроссинговера между ориентированными в одну сторону мобильными элементами (*б*) или инверсии из-за кроссинговера между противоположно ориентированными элементами (*в*)

В случае ретротранспозонов особые возможности для перенесения и изменения регуляторных сигналов возникают тогда, когда сам элемент удаляется за счет кроссинговера между LTR с идентичными последовательностями (рис. 6.33, *а*), в результате чего сохраняется лишь один LTR на месте внедрения ретротранспозона. Это явление широко распространено в клетках дрожжей. Установлено, что такие одинокие LTR оказывают серьезное влияние на регуляторные системы дрожжевой клетки.

3. Формирование хромосомных перестроек.

В результате кроссинговера между одинаково ориентированными элементами возникает делеция и дупликация материала, расположенного между инсерциями (см. рис. 6.33, *б*). Если инсерции ориентированы в противоположном направлении, возникает инверсия (*в*).

4. Формирование теломер. У дрозофилы отсутствует теломеразная машина, но концы ДНК удлиняются за счет перемещений ретротранспозонов (см. разд. 9.6).

5. Участие в горизонтальном переносе генов.

Инфекционные ретровирусы способны заражать организмы, принадлежащие разным видам, и переносить собственный генетический материал, образуя копии ДНК, встраивающиеся в геном. Таким образом могли распространяться ретротранспозоны. Подобный способ передачи генов получил название горизонтального в отличие от вертикального наследования генов из поколения в поколение. Широкое распространение транспозона *mariner* среди филогенетически отдаленных групп насекомых может свидетельствовать о повторных переходах данного элемента от вида к виду. Так, один из ретротранспозонов дрозофилы (*gypsy*), как оказалось, является настоящим ретровирусом: путем инъекции или скармливания вирусных частиц удается заразить мух, не несущих эти ретротранспозоны.

6. Транспозоны на основе *P*-элемента используют для трансформации у эукариот, клонирования генов, поиска энхансеров и т. д. (см. гл. 7).

Литература к разделу 6.7

Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. 1. Структура, механизмы перемещения и роль подвижных элементов в поддержании целостности хромосом // Соросовский образовательный журн. 1998. № 8. С. 8–14.

Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Там же. С. 15–21.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. С. 480–481, 841.

Ратнер В. А., Васильева Л. А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журн. 2000. № 6. С. 14–20.

Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Юрченко Н. Н., Голубовский М. Д. Современная генетика локуса *white* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1988. Vol. 29. С. 581–591.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 91–97, 987–988.

Capy P., Bazin C., Higuet D., Langin T. Dynamics and evolution of transposable elements. New York: Chapman and Hall, 1998. 197 p.

Cooley L., Kelley R., Spradling A. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements // Science. 1988. Vol. 239. P. 1121–1128.

Engels W. R. Invasions of P elements // Genetics. 1997. Vol. 145. P. 11–15.

Federoff N. V. Barbara McClintock (June 16, 1902 — September 2, 1992) // Genetics. 1994. Vol. 136. P. 1–10.

Finnegan D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution // Trends in Genetics. 1989. Vol. 5. P. 103–107.

Lai C. Genetic application of transposable elements in eukaryotes // Genome. 1994. Vol. 37. P. 519–525.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 457–505.

Lindsley D. L., Zimm G. G. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego; New York: Academic Press, 1992. P. 773.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 655–678.

6.8. МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПРОКАРИОТ

У прокариот существуют три типа мобильных элементов — *IS*-элементы (insertion sequence), транспозоны (*Tn*) и некоторые бактериофаги.

6.8.1. *IS*-элементы

Эти элементы содержат только минимальное число генов, необходимых для мобилизации элемента и его инсерции в новый участок хромосомы. *IS*-элементы являются обычным компонентом бактериальных хромосом и плазмид. Три инсерционных элемента — *IS1*, *IS2* и *IS10*R представлены в геноме *E. coli* в 0–30 копиях. Их размеры варьируют от 768 до 1329 пн. Некоторое число копий этих элементов встречается в плазмидах. Они содержат ген транспозазы. На концах *IS*-элементов находятся инвертированные повторы IR, длина которых варьирует от 9 до 41 пн. В участке встраивания *IS*-элементов в геномной ДНК образуется дупликация размером от 5 до 9 пн (рис. 6.34).

Поскольку *IS*-элементы встраиваются в любой участок ДНК, они часто вызывают мутации, разрушая кодирующие или регуляторные последовательности.

Промоторы в самом *IS*-элементе могут влиять на экспрессию соседних генов. Из-за присутствия *IS*-элементов в хромосоме кроссинговер между ними может вызывать делеции и инверсии.

В процессе перемещения *IS*-элементов происходит точное копирование уже встроенного элемента, затем старая копия остается на месте, а вновь синтезированная внедряется в новый сайт. Репликация новой копии происходит с использованием энзимов репликационной машины клетки-хозяина. Транспозиция происходит с использованием транспозазы, которая опознает IR-последовательности, где и инициируется транспозиция. Мутации в IR-фрагментах влияют на частоту транспозиции, которая варьирует между 10^{-5} и 10^{-7} на одно поколение.

6.8.2. Транспозоны

Эти элементы (*Tn*) устроены значительно сложнее. Известны два типа транспозонов прокариот: сложные и несложные. Сложные (composite) транспозоны имеют центральный район, содержащий гены. На обоих концах транспозона расположены *IS*-элементы (рис. 6.35). Оба *IS*-элемента в пределах одного транспозона принадлежат к одному типу и называются «левый» и «правый».

Транспозоны *E. coli* варьируют по длине от 2638 пн до 9300 пн, имеют гены чувствительности к антибиотикам, *IS*-элементы на концах. В участках встраивания в хромосоме хозяина образуется дупликация длиной 9 пн. Транспозиции происходят, поскольку один или оба *IS*-элемента кодируют транспозазу.

Несложные (noncomposite) транспозоны также содержат гены устойчивости к антибиотикам, однако эти транспозоны не терминируются *IS*-элементами. На своих концах они все-таки имеют повторенные последовательности, необходимые для транспозиций (рис. 6.36).

6.8.3. *IS*-элементы и транспозоны в плазмидах

Как уже упоминалось (гл. 5), одной из первых открытых плазмид была плазмида *F* (*F*-

Рисунок 6.34

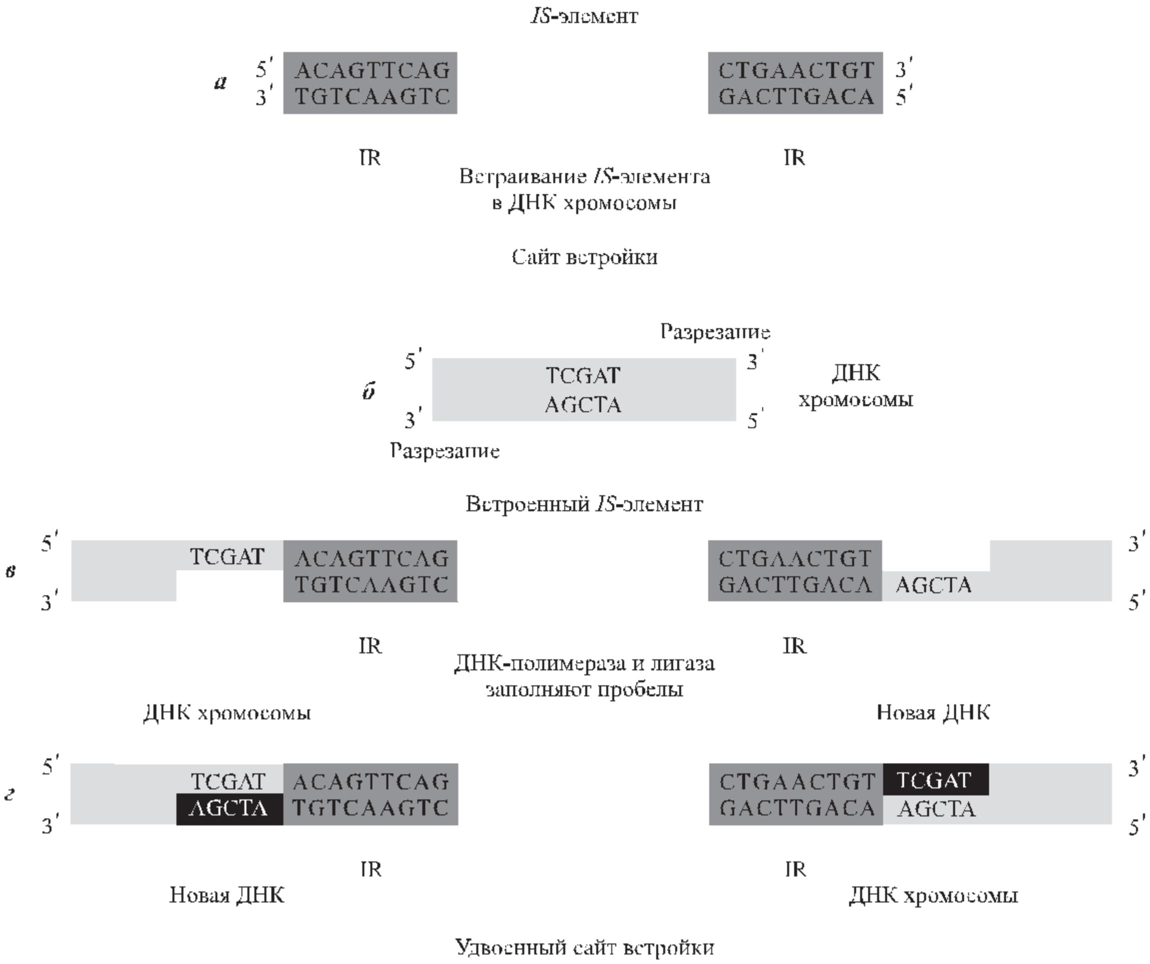
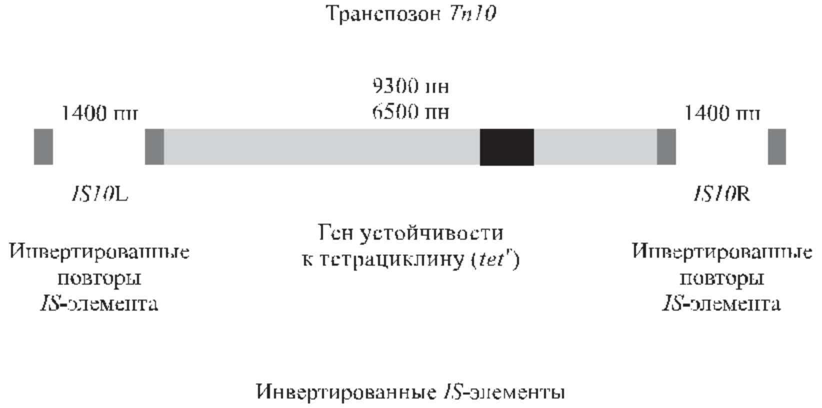


Схема строения и инсерции *IS*-элемента в хромосомную ДНК бактерии [Russell, 1998. P. 657]: *а* — *IS*-элемент с IR-повторами длиной 9 пн; *б* — образование двухцепочечного надреза в ДНК бактерии; *в* — инсерция *IS*-элемента в участке надреза; *г* — достраивание фрагмента ДНК в участке надреза и образование дупликации геномной ДНК бактерии

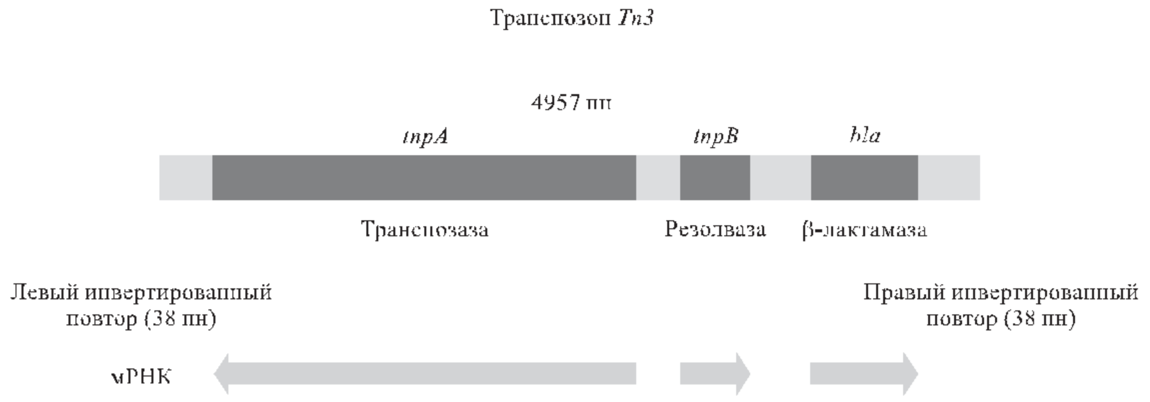
Рисунок 6.35



Структура сложного (composite) транспозона *Tn10* в геноме *E. coli* [Russell, 1998. P.658].

Центральный район, несущий ген или гены сопротивляемости к тетрациклину, фланкирован прямыми или инвертированными *IS*-элементами. В свою очередь *IS*-элементы имеют собственные терминальные инвертированные повторы

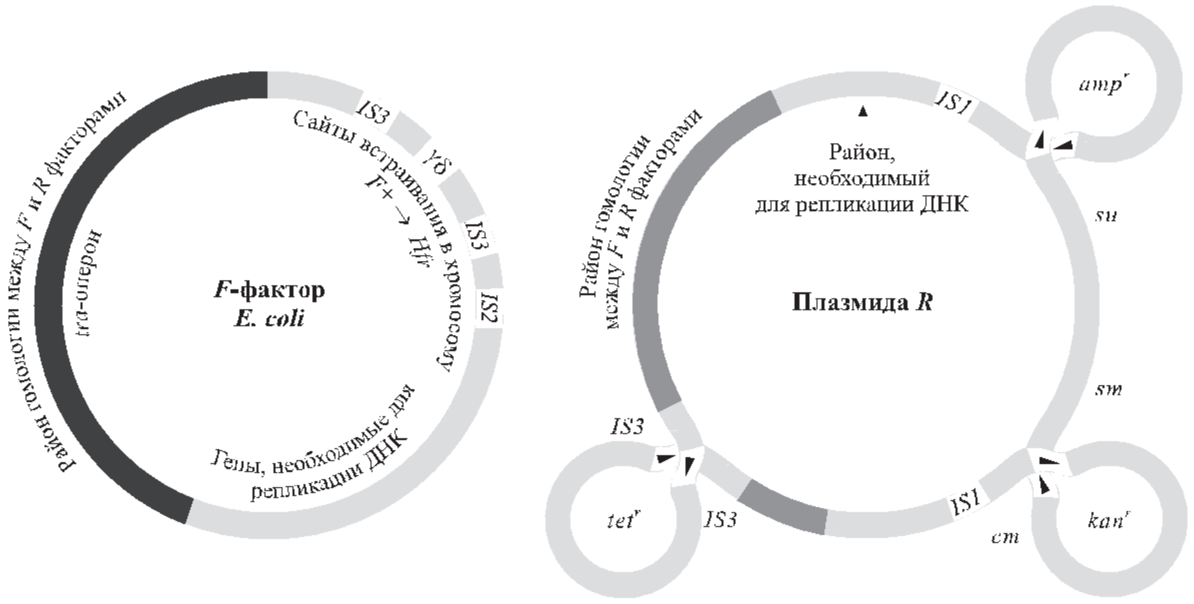
Рисунок 6.36



Структура несложного (noncomposite) транспозона *Tn3* [Russell, 1998. P. 659].

В центральном районе имеется три гена: *bla* кодирует β-лактамазу (разрушает антибиотики, такие как пенициллин или ампициллин), *tnpA* — транспозазу, *tnpB* — резолвазу (вовлечена в процесс транспозиции). Короткие инвертированные повторы на концах не связаны с *IS*-элементами

Рисунок 6.37



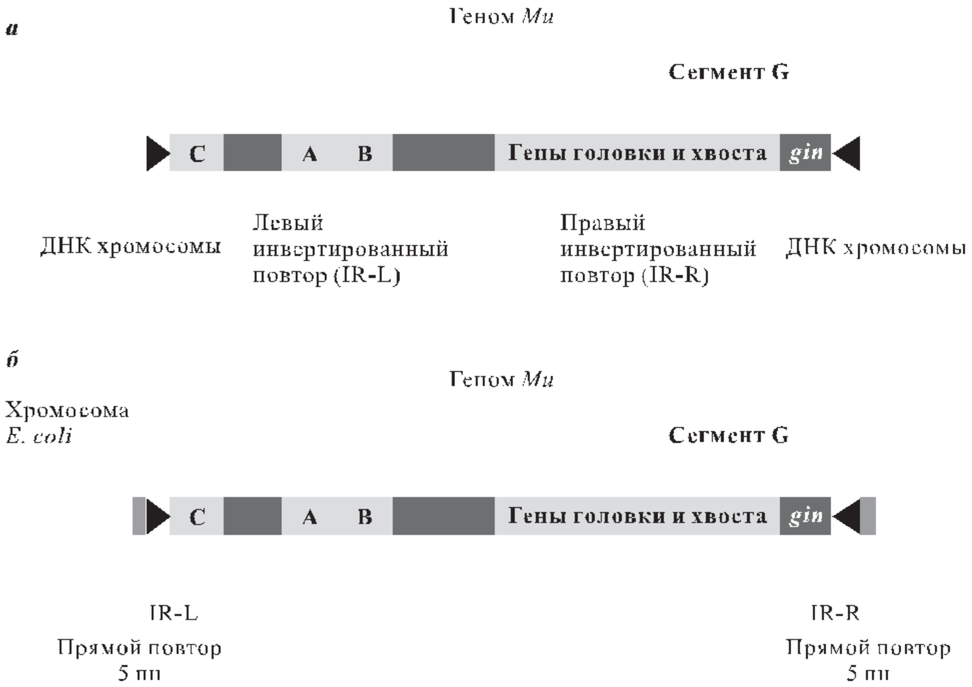
Карты *F*-фактора *E. coli* и плазмиды *R* [Russell, 1998. P. 661]

фактор). Эта кольцевая структура имеет длину 94,5 тпн и содержит ряд генов: а) *tra* (transfer) — гены, необходимые для переноса ДНК из бактерии-донора в бактерию-реципиент, б) гены, необходимые для репликации плазмиды, в) четыре *IS*-элемента: две копии *IS3*, одну копию *IS2* и один элемент — $\gamma\delta$ (рис. 6.37).

Поскольку в различных позициях в хромосоме *E. coli* имеются копии этих же инсерционных элементов, *F*-фактор может встраиваться в различные участки бактериальной хромосомы и в различной ориентации. Встраивание происходит за счет кроссинговера между гомологичными последовательностями инсерционных элементов.

Плазмида *R* имеет те же *tra*-гены, что и *F*-фактор, а также гены, небходимые для репликации ДНК, есть две копии элемента *IS1* и три гена резистентности к антибиотикам — *amp* (ампициллин), *kan* (канамицин) и *tet* (тетрациклин) (см. рис. 6.37). Эти гены фланкированы терминальными повторенными последовательностями и, следовательно, сами являются истинными транспозонами. Плазмида *R*,

Рисунок 6.38



Структура генома умеренного бактериофага *Mu* в виде фаговой частицы (*а*) или профага, встроенного в хромосому *E. coli* (*б*) [Russell, 1998. P. 662]

обычно находящаяся у патогенной бактерии *Shigella*, передается другим (нерезистентным к антибиотикам) штаммам этого вида, а также другим бактериям, населяющим кишечник человека, в результате чего они приобретают устойчивость к данным антибиотикам.

6.8.4. Бактериофаг Mu

Это умеренный бактериофаг, инфицирующий *E. coli* («умеренный» — значит, может проходить через литический цикл или лизогенную стадию). В то же время это транспозон и он может вызывать мутации в результате встраивания.

В фаговой частице *Mu* геном содержит 37 тпн линейной молекулы ДНК, главным образом фаговой с небольшими фрагментами ДНК из хромосомы *E. coli* на каждом из концов (рис. 6.38).

Литература к разделу 6.8

Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984.
Russell P. J. Genetics. 5[th] ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 655–678.

Глава 7
СТРУКТУРА ГЕНА

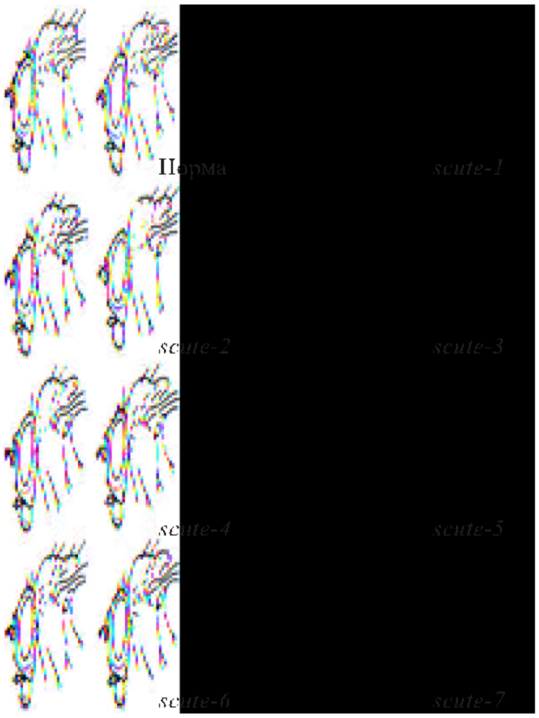
7.1. РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ГЕНЕ

К концу 20-х гг. сложилось представление о гене как материальной частице, лежащей в хромосоме, способной к саморепродукции и являющейся минимальной единицей рекомбинации, мутирования и генетической функции. Цепочка сцепленных генов представлялась как нитка корпускул или бусинок, механически связанных друг с другом. Ген, согласно этим представлениям, считался неделимым путем кроссинговера. Нормальному аллелю противопоставлялся мутантный. Для объяснения существования пар аллелей уже в 1902 г. К. Корренс и У. Бэтсон предложили теорию, согласно которой доминантный признак обусловливается наличием определенного гена, а рецессивный — выпадением, отсутствием этого гена. Эта теория получила название теории «присутствия — отсутствия». Она очень просто объясняла существование пар аллей. Вначале признавал ее и Т. Морган. Однако затем, когда были открыты большие серии промежуточных мутаций, в разной степени изменяющих признаки, т. е. серии аллельных генов, эта теория подверглась критике. Морган отказался от нее. Как писал А. С. Серебровский, «эпитафией к этой теории явились слова Моргана: „Не могут одному присутствию отвечать несколько отсутствий“» [Цит. по: Хесин, 1972].

В целом представления школы Т. Х. Моргана можно кратко представить следующим образом: ген имеет основные свойства хромосом (способность к редупликации, к закономерному распределению в митозе и мейозе), занимает определенный участок (локус) хромосомы, является единицей мутации (т. е. изменяется как целое), единицей рекомбинации (т. е. кроссинговера никогда не наблюдали в пределах гена), единицей функции (т. е. все мутации одного гена нарушают одну и ту же функцию). Поэтому при получении серии мутаций с похожим фенотипом для определения того, затронула мутация один и тот же ген или разные, Морган предложил два теста: функциональный и рекомбинационный. Функциональный критерий основывается на том, что при скрещивании двух мутантов возникает дигетерозигота, имеющая дикий фенотип в силу доминирования нормальных аллелей каждого из генов (мутации комплементарны друг другу). Если скрещиваемые мутанты несут в дигетерозиготе аллельные мутации, то дикий тип не появляется, так как оба аллеля одного и того же гена в разных хромосомах имеют мутационные изменения, или, по-другому, мутации не комплементарны. При этом мутации не должны разделяться кроссинговером.

В 1929 г. А. С. Серебровский и Н. П. Дубинин описали серию индуцированных мутаций гена *scute* (*sc*), нарушающих формирование разных щетинок у дрозофилы (рис. 7.1).

Рисунок 7.1


[redacted]

Влияние разных мутаций гена *scute* на развитие щетинок у дрозофилы [Серебровский, Дубинин, 1929]

Но самое поразительное выяснилось, когда получили самок, у которых в одной *X*-хромосоме находился один аллель, а в другой хромосоме — другой аллель этого гена. В таких компаундах редуцированными были только те щетинки, которые повреждались обоими аллелями, а щетинки, развитые у мутантов по одному из них и редуцированные у мутантов по другому, в компаунде оказывались нормальными.

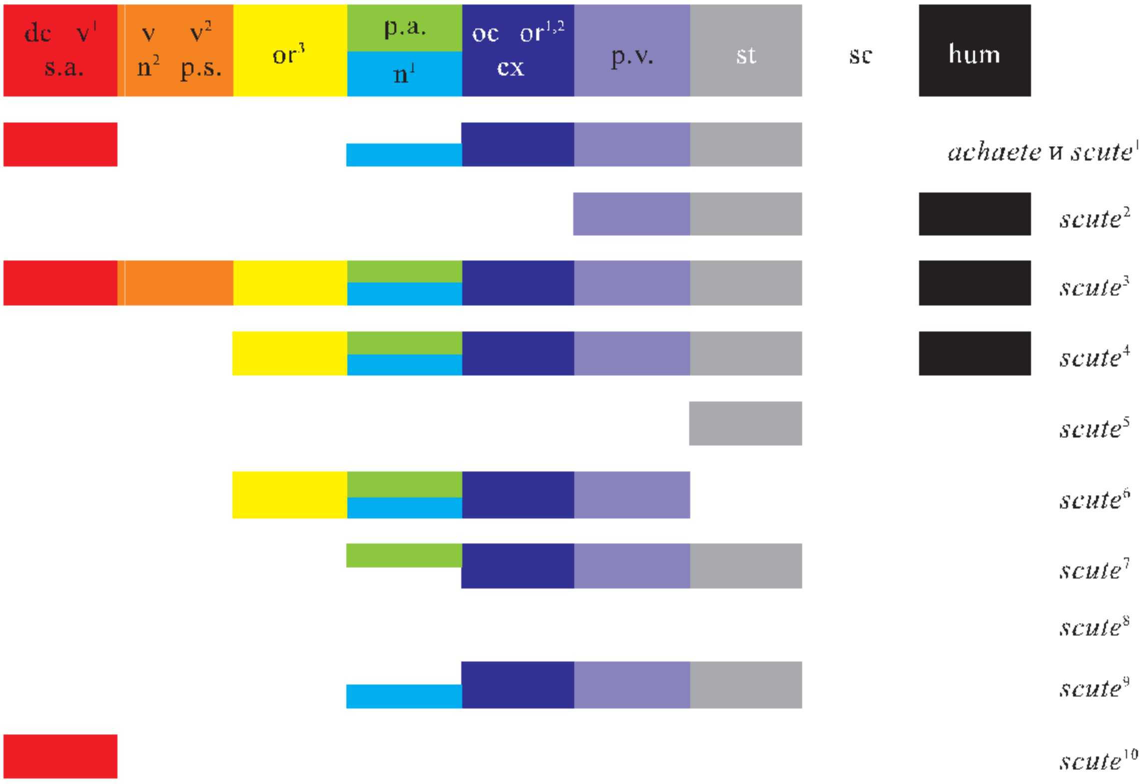
Более того, если два аллеля нарушали развитие совсем разных щетинок, то в компаунде они давали возврат к норме: развивались все щетинки, например у особей sc^5/sc^6, что было показано в работе Серебровского и Дубинина в 1929 г. Обсуждая эти факты, авторы написали: «...явление частичного возврата к дикому типу может быть истолковано как обусловленное не полным аллелизмом двух аллелей. С этой точки зрения... общие части проявляются в силу того, что в обеих хромосомах имеются изменения одинаковых участков, другими словами, по этим участкам муха гомозиготна; непроявление же несовпадающих участков зависит от того, что измененному участку одной хромосомы соответствует участок второй хромосомы, который не был затронут трансгенацией...» И далее особенно важный вывод: «Это весьма ответственное воззрение, утверждающее ДЕЛИМОСТЬ гена...» [Цит. по: Хесин, 1972. С. 20]. Была построена карта нарушений щетинок (рис. 7.2).

Авторы назвали ген *scute* базигеном, т. е. участком хромосомы, занимаемым всеми изменениями — трансгенами *scute*. Самостоятельные при трансгенациях (мутациях) элементарные участки внутри базигена были названы центрами. Мутации могут захватывать как отдельные центры, так и целые их группы. При этом аллели расположены ступенчато.

Эта теория сложного (центрового) строения, или делимости, гена, имеющего одномерную протяженность, не была поддержана крупнейшими генетиками того времени (А. Стёртевантом, Дж. Шульцем, Р. Гольдшмидтом, Г. Мёллером) [Хесин, 1972].

Много позже М. Грин и К. Грин (1949) показали делимость гена *lz* у дрозофилы посред-

Рисунок 7.2



План гена («базигена») *scute* и его мутаций («трансгенаций») [Серебровский, Дубинин, 1929].

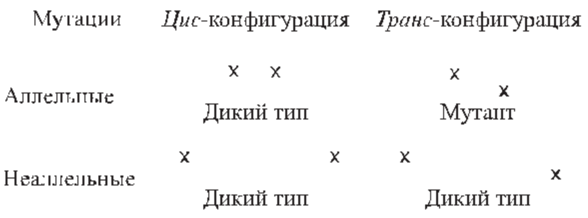
Мутации нарушают развитие щетинок:
dc — дорзоцентральных, v^1, v^2 — вертикальных, s.a. — супраалярных, v — вентральных, p.s. — пресутуральных, $or^{1,2,3}$ — орбитальных, p.a. — посталярных, $n^{1,2}$ — нотоплевральных, oc — оцеллярных, cx — коксальных, p.v. — поствертикальных, st — стернальных, sc — скутеллярных, hum — гумеральных

ством кроссинговера. Они получили гетерозиготы

$$\frac{lz^{BS}}{lz^{g}},$$

0,1 % потомков от которых имели либо нормальные глаза, либо более сильное мутантное проявление, чем любой из аллелей. Это могло произойти только в результате кроссинговера внутри этого гена. Чтобы спасти представление о неделимости гена, такие аллели стали называть псевдоаллелями.

После того как установили, что ген можно разделить кроссинговером, стали искать новые варианты определения гена и модификации функционального теста. Э. Льюис предложил *цис-транс*-тест, суть которого состоит в том, что при скрещивании двух особей, несущих мутации в негомологичных участках хромосомы, возникает зигота с *транс*-конфигурацией этих мутаций.



Если мутации комплементарны, т. е. появляется гибрид дикого типа, то их относят к разным генам. Если гибрид оказывается мутантным, то обе мутации относят к одному гену, т. е. считают их аллельными. При скрещивании двух особей, одна из которых несет оба этих генотипических изменения, а другая представляет собой дикий тип, образуется зигота с *цис*-конфигурацией мутаций. Гибрид дикого типа возникает и тогда, когда обе мутации затрагивают один ген, и когда оказываются мутантными два разных гена. Таким образом, *цис-транс*-тест сводится фактически к *транс*-тесту, т. е. к функциональному критерию аллелизма, предложенному ранее Морганом.

Огромный вклад в понимание структуры и функции гена внесли Дж. Бидл и Э. Тейтум, которые в начале 40-х гг. впервые исследовали биохимические мутации у *Neurospora crassa*. Эти исследования показали, что мутации ауксотрофности у нейроспоры прерывают цепи метаболизма на конкретных этапах. Причем аллельные мутации всегда затрагивали один и тот же этап биосинтеза. На основе своих результатов Дж. Бидл и Э. Тейтум сформулировали принцип «один ген — один фермент», означавший, что каждый ген контролирует синтез какого-либо определенного фермента.

В 1961 г. С. Бензер изучал область *rII* фага Т4. Он сопоставил молекулярные размеры этой области — 2700 пн и рекомбинационную длину — 10 %. В экспериментах были получены минимальные частоты рекомбинации — около 0,02 %, т. е. 1/500 от всего рекомбинационного расстояния (10 %). Если весь район имеет длину 2700 пн, значит, рекомбинация происходит между каждыми 5–6 нуклеотидами (2700 : 500).

Позже Ч. Яновский показал, что кроссинговер происходит между любой парой нуклеотидов (реконом).

Таким образом, не только ген, но и любая его часть может быть разделена с помощью кроссинговера.

В 1957 г. С. Бензер предложил называть участок хромосомы, в пределах которого обнаруживается *цис-транс*-эффект, цистроном. Цистрон определяет одну функцию.

Ген по современным представлениям можно определить как единицу наследственной информации, занимающую определенное положение в геноме или хромосоме и контролирующую выполнение определенной функции в организме.

Организация генов несколько различна у про- и у эукариот. Сначала будет рассмотрен оперонный принцип строения генов у прокариот, затем, после характеристики современных методов изучения генов, будут изложены основы организации генов у эукариот.

Дополнение 7.1

За открытие того, что ген действует, регулируя определенные химические события, Дж. Бидл (G. W. Beadle) и Э. Тейтум (E. L. Tatum) получили Нобелевскую премию в 1958 г.

Литература к разделу 7.1

Голубовский М. Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. Научно-исторические очерки. СПб.: Борей Арт, 2000. 262 с.

Дубинин Н. П. Избранные труды: В 4 т. Т. 1. Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 64–130.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 370–380.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 454–464.

Серебровский А. С., Дубинин Н. П. Искусственное получение мутаций и проблема гена // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 294–302. (Успехи эксп. биол. 1929. Т. 4. С. 235–247).

Хесин Р. Б. Теория гена в работах А. С. Серебровского // Природа. 1972. № 8. С. 16–27.

7.2. ОПЕРОННЫЙ ПРИНЦИП ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ

Бактериям необходимо уметь быстро отвечать на изменения в окружающей среде. Их выживаемость зависит от способности переключать метаболизм с одного субстрата на другой, поскольку поступление питательных веществ может постоянно меняться.

Бактерия не синтезирует ферментов того или иного метаболического пути в отсутствие соответствующего субстрата, но способна в любое время начать их синтез при появлении такового. Для осуществления подобного реагирования гены бактерий объединены в кластеры таким образом, что ферменты, необходимые для определенного пути биосинтеза, кодируются генами, находящимися под общим контролем.

Клетки *E. coli* в отсутствие β-галактозида содержат очень незначительное число молекул фермента, расщепляющего его, — буквально несколько штук. Функция фермента сводится к расщеплению молекулы β-галактозида на составляющие сахара. Например, лактоза разлагается на глюкозу и галактозу, которые в свою очередь используются в дальнейшем метаболизме. При добавлении галактозида в бактериальных клетках очень быстро усиливается активность фермента в результате синтеза новых молекул, которые появляются уже через 2–3 мин. Вскоре их число в клетке превышает 5000. При удалении субстрата из среды синтез фермента прекращается так же быстро, как был начат.

Быстрое увеличение активности фермента за счет его синтеза под действием субстрата называется индукцией, а уменьшение активности, также под действием субстрата — репрессией генов.

Гены можно поделить на две группы по принципу действия их продукта. Гены, которые кодируют белки, необходимые для ферментативных или структурных функций, называются структурными. Большинство генов бактерий попадают в эту категорию, которая, таким образом, представлена огромным разнообразием функций и структур белков.

Гены, кодирующие белки, которые регулируют экспрессию других генов, называются регуляторными. Поскольку продукты регуляторных генов свободно диффундируют и находят подходящие мишени для активирования, такой тип взаимодействия генов называют *транс*-регуляцией. *Транс*-действующий белок может регулировать ген-мишень либо позитивно, если в результате взаимодействия регулируемый ген включается, либо негативно, если он выключается. Белок-регулятор связывается с *цис*-регулирующей последовательностью регулируемого гена, которая располагается обычно (но не всегда) рядом с геном-мишенью.

Структурные гены бактерий имеют тенденцию быть организованными в кластеры генов, кодирующих белки, чьи функции связаны.

Пример кластерной организации у *E. coli* представляют лактозные гены, которые индуцируются и репрессируются под действием субстрата.

Весь кластер генов занимает около 6000 пн (рис. 7.3). Ген *lacI* имеет свои промотор и терминатор. Конец района *lacI* непосредственно примыкает к промотору P_{lac}, оператор O_{lac} за-

Рисунок 7.3

	P	*lacI*	PO	*lacZ*	*lacY*	*lacA*
ДНК (длина в пн)		1040	82	3510	780	825
Полипептид:						
аминокислот		360		1021	260	275
дальтон		38 000		125 000	30 000	30 000
Белок:						
структура		Тетрамер		Тетрамер	Мембранный белок	Димер
размер, кДа		152 000		500 000	30 000	60 000
Функция белка		Репрессор		β-Галактозидаза	Пермеаза	Трансацетилаза
мРНК					Один транскрипт	

Размеры генов, белков и их функции в лактозном опероне у *E. coli* [Lewin, 1994. P. 416].
P — промотор, O — оператор

Рисунок 7.4

Нобелевские лауреаты 1965 г. Андрэ Львов, Франсуа Жакоб и Жак Моно в аэропорту после прилета из Стокгольма. В портфеле нобелевские дипломы

нимает первые 26 пн гена *lacZ*. После гена *lacZ*, который имеет необычно большую длину, расположены гены *lacY* и *lacA*, а также общий терминатор транскрипции.

Гены имеют следующие функции: продукт *lacZ* расщепляет β-галактозид на составляющие его сахара, продукт гена *lacY* является β-галактозид-пермеазой, он транспортирует β-галактозид в клетку. Ген *lacA* кодирует белок трансацетилазу — энзим, который переносит ацетильную группу с ацетил-CoA на β-галактозид.

Мутации генов *lacZ* и *lacY* дают фенотип Lac^{-}, когда клетки не могут использовать лактозу. У мутантов *lacZ* отсутствует ферментативная активность β-галактозидазы. Мутанты по гену *lacY* не могут усваивать лактозу из среды. Мутанты по гену *lacA* не имеют фенотипического проявления, что довольно неожиданно.

Вся эта система, включающая структурные гены и элементы, контролирующие их экспрессию, формирует общую единицу регуляции, называемую опероном. Модель оперона была предложена в 1961 г. Ф. Жакобом и Ж. Моно (рис. 7.4). В короткое время эта модель оказалась в центре внимания не только генетиков, но и огромного числа биологов во всем мире. Она позволила увидеть реальный механизм регуляции активности генов.

Дополнение 7.2

За открытие механизмов генетического контроля синтеза ферментов Нобелевскую премию в 1965 г. получили Ф. Жакоб (Francois Jacob), А. Львов (Andre Lwoff) и Ж. Моно (Jacques Monod).

Транскрипция генов *lacZ, Y, A* контролируется белком-репрессором, кодируемым геном *lacI*. Гены *lacZ, Y, A* контролируются негативно: транскрипция их идет до тех пор, пока не выключается белком-репрессором. Мутации гена-репрессора обусловливают постоянную транскрипционную активность генов *lacZ, Y, A*. Белок lac-репрессор связывается с оператором O_{lac} на старте транскрипции кластера *lacZ, Y, A* и предотвращает движение РНК-полимеразы и инициацию транскрипции (рис. 7.5).

Белок-репрессор имеет два сайта связывания: один для индуктора, другой для оператора. Когда индуктор (лактоза) поступает в клетки и связывается со своим сайтом, это так изменяет конформацию молекулы белка, что нарушается связывающая способность другого сайта. В результате репрессор становится не способным сдерживать транскрипцию и она начинается. При удалении индуктора репрессор вновь занимает положение на операторе, останавливая транскрипцию.

Основным преимуществом оперонной организации генов у микроорганизмов является координация регуляции активности: все гены экспрессируются или не экспрессируются в унисон. Матричная РНК транслируется всегда с 5'-конца. Это объясняет, почему индукция всегда обусловливает появление в клетке β-галактозидазы, β-галактозид-пермеазы и только затем β-галактозид-трансацетилазы. А факт трансляции единой мРНК объясняет, почему относительные количества всех трех ферментов остаются одинаковыми независимо от условий индукции.

По данным, полученным в ходе реализации геномного проекта *E.coli*, завершившегося в 1997 г. полным секвенированием ДНК, в геноме кишечной палочки выявлено и предсказано 2584 оперона. Среди них 73 % содержат один цистрон, 16 % — 2 цистрона, 4,6 % — 3 цистрона (в том числе *lac*-оперон), 6 % — 4 и более цистрона (в том числе *trp*-, *his*-опероны). Все они имеют не менее одного промотора и управляются регуляторными белками через специфические функциональные сайты управления [Blattner et al., 1997; Ратнер, 2002].

У эукариот опероны не обнаружены.

Литература к разделу 7.2

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 239–252.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. С. 176–201.

Ратнер В. А. Что содержит полный геном *Escherichia coli*? // Соросовский образовательный журн. 2002.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. 1997. Vol. 277. P. 1453–1462.

Brenner S. A night at the operon // Nature. 1997. Vol. 386. P. 235.

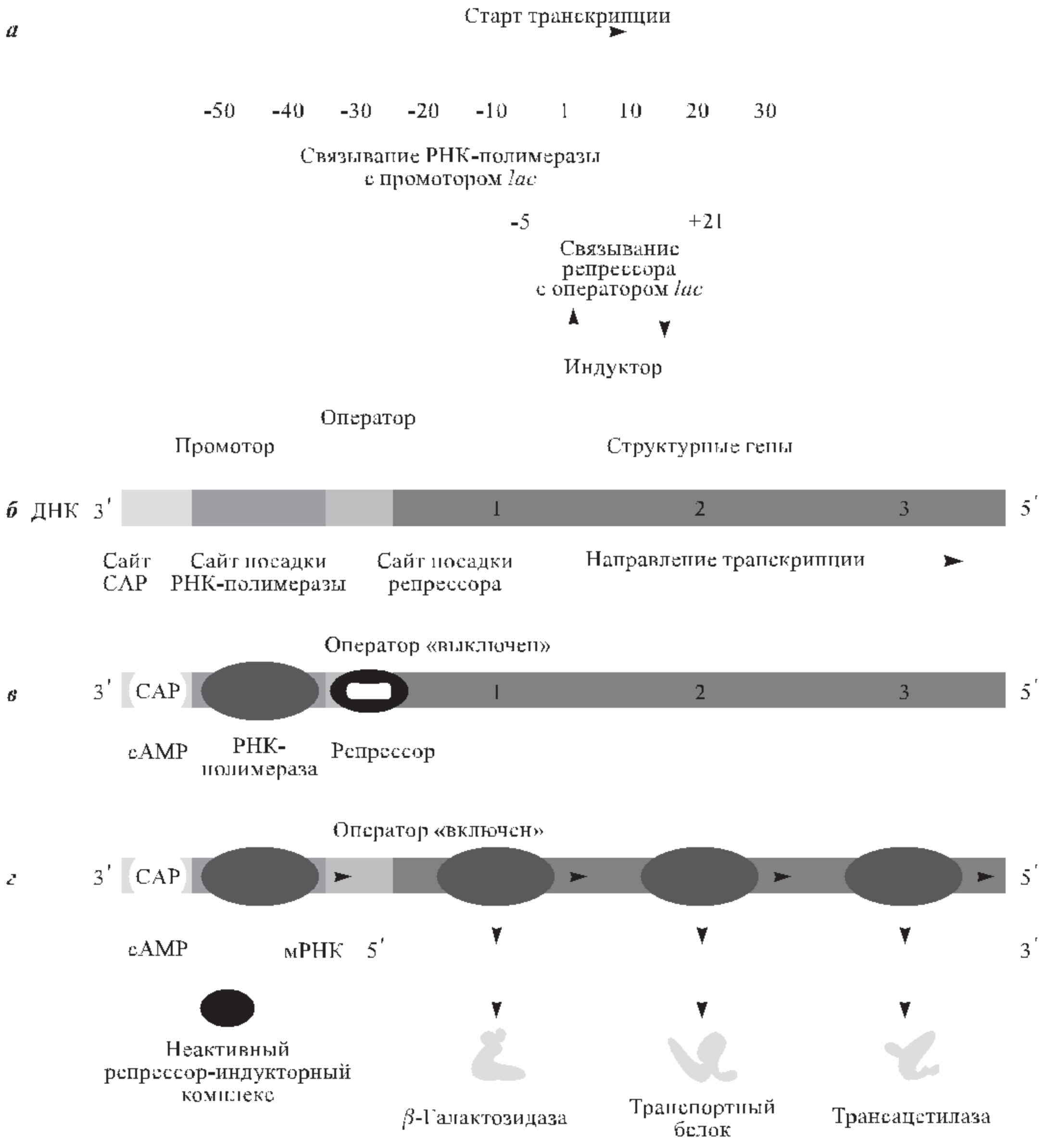
Curtis H., Barnes N. S. Biology. 5th ed. New York: Worth Publishers Inc., 1989. P. 320–326.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 413–432.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 273–318.

Russell P. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 501–534.

Рисунок 7.5



Функционирование лактозного оперона у *E. coli*:

а — локализация сайтов связывания молекул РНК-полимеразы и репрессора в регуляторной области гена *lacZ* [Lewin, 1994. P. 417]; *б* — структура лактозного оперона (как и у всех генов, регулируемых CAP и cAMP, промотор содержит два района: участок связывания с РНК-полимеразой и участок связывания с комплексом CAP–cAMP); *в* — негативная, *г* — позитивная регуляция *lac*-оперона [*б–г* — Curtis, Barnes, 1989. P. 325].

В отсутствие лактозы репрессор (продукт гена *lacI*) связывается с оператором. Хотя РНК-полимераза может связываться с промотором, она не перемещается далее репрессора. Оператор выключен, гены не работают. В присутствии лактозы репрессор инактивируется и более не связывается с оператором. Молекулы РНК-полимеразы перемещаются, и начинается транскрипция

7.3. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕНОВ

Известно несколько способов получения генов:

1. Непосредственное выделение из природных источников (клонирование).
2. Химический синтез.
3. Копирование соответствующей гену мРНК для получения комплементарной ДНК-реплики (кДНК).

Искусственный синтез гена был впервые осуществлен химическим путем в 1969 г. Г. Хораной и его сотрудниками. Группа Хораны синтезировала ген аланиновой тРНК дрожжей, структура которого к тому времени была полностью расшифрована. Ген длиной 77 пн не содержал регуляторных последовательностей и поэтому не обладал функциональной активностью. Позднее та же группа авторов синтезировала первый функционально активный ген — ген супрессорной тирозиновой тРНК *E. coli* длиной около 200 пн.

Искусственно синтезированные гены могут экспрессироваться в составе гибридных молекул микроорганизмов. Первой удачной попыткой такого рода стала работа К. Итакуры и Г. Бойера с соавторами (1977) по экспрессии в *E. coli* гена, кодирующего гормон млекопитающих — соматостатин. Ген соматостатина был получен на основе сведений о первичном строении этого пептидного гормона, состоящего всего из 14 аминокислот. В различных лабораториях были созданы штаммы *E. coli*, продуцирующие гормон роста человека — соматотропин, пептидные гормоны брадикинин и ангиотензин, нейропептид лей-энкефалин, интерферон.

Ген гормона роста человека, имеющий размер 584 пн, — наиболее длинный из искусственно синтезированных в настоящее время. Он был встроен в плазмиду, реплицирующуюся в *E. coli* под контролем промотора триптофанового оперона. Трансформированные полученной химерной плазмидой клетки *E. coli* продуцировали при индукции промотора около 3 млн молекул гормона роста человека в расчете на клетку. Этот полипептид, как было установлено в экспериментах на крысах с удаленным гипофизом, по функциям оказался полностью идентичен гормону роста человека.

Ген инсулина синтезировали в виде более чем 40 шестичленных олигонуклеотидов, которые затем объединяли с помощью ДНК-лигазы. Полученные двухцепочечные полинуклеотиды длиной 271 и 286 пн были встроены в плазмиды. Туда же были включены регуляторные участки ДНК, обеспечивающие экспрессию гибридных молекул. Клонированные гены кодировали синтез проинсулина, который путем несложной химической обработки можно превратить в активный гормон, состоящий из двух полипептидных цепей A и B длиной 21 и 30 аминокислотных остатков, соединенных между собой дисульфидными связями.

Используется также метод искусственного получения генов, основанный на их ферментативном синтезе с помощью механизма обратной транскрипции. Этот механизм связан с активностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы, или обратной транскриптазы (ревертазы), — фермента, впервые обнаруженного при исследовании репликации РНК онкогенных вирусов. Фермент способен строить копии ДНК на разных РНК, включая синтетические полирибонуклеотиды. С помощью ревертазы можно синтезировать практически любой ген в присутствии соответствующих мРНК, методы выделения которых достаточно хорошо разработаны. Данный метод удобно применять для генов, исключительно интенсивно транскрибируемых в определенной ткани.

Таким способом получены и клонированы гены, кодирующие глобины человека, других млекопитающих и птиц, белок хрусталика глаза быка, яичный белок, фиброин шелка и некоторые другие [Алиханян и др., 1985].

Литература к разделу 7.3

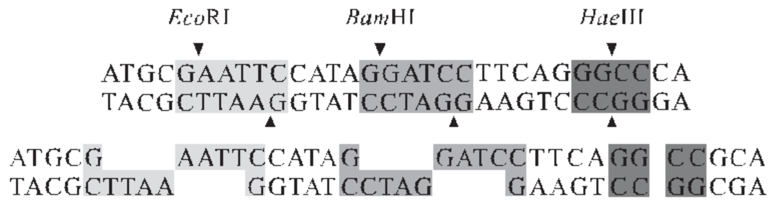
Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 415–418.

7.4. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Процесс молекулярного клонирования, или избирательного накопления идентичных молекул ДНК, состоит из нескольких этапов: фрагментация ДНК путем обработки эндонуклеазой рестрикции, объединение этих фрагментов *in vitro* с векторной молекулой ДНК (способной к автономной репликации), введение вектора в реципиентский организм, в котором и происходит накопление рекомбинантных ДНК.

Формальной датой рождения генной инженерии считают 1972 г., когда группа П. Берга в США создала первую рекомбинантную ДНК *in vitro*, объединившую в своем составе генетический материал из трех источников: пол-

Рисунок 7.6



Последовательность нуклеотидов, содержащая сайты, распознаваемые различными рестриктазами [Алиханян и др., 1985. С. 415]

ный геном онкогенного вируса обезьян SV40, часть генома умеренного бактериофага λ и ген лактозного оперона *E. coli*. Сконструированная рекомбинантная молекула не была исследована на функциональную активность, поскольку у авторов возникли опасения, что методы генной инженерии могут привести к появлению микроорганизмов, опасных для здоровья человека, например бактерий *E. coli*, способных перенести онкогенные вирусы животных в кишечник человека.

Функционально активные молекулы гибридной ДНК были впервые получены С. Коэном, Д. Хелински, Г. Бойером и их сотрудниками в 1972–1973 гг.

7.4.1. Ферменты рестрикции

В 1962 г. В. Арбер показал, что в бактериях действуют специальные ферменты, способные специфично отличать свою (бактериальную) ДНК от чужой (фаговой). Эти ферменты рестрицируют (т. е. ограничивают) возможность размножения фаговой ДНК в бактериях путем ее более или менее специфичной деградации. Такие ферменты были названы эндонуклеазами рестрикции, или рестриктазами. Естественной функцией рестриктаз является защита бактерии от инфекции вирусами. ДНК в сайтах рестрикции у самой бактерии модифицирована метилированием, так что фермент рестрикции не может расщеплять свою собственную ДНК. Однако вирусная ДНК не защищена метильными группами, и ферменты расщепляют ее.

Первая рестриктаза, специфично расщепляющая двухцепочечную ДНК в строго определенных сайтах, была выделена Х. Смитом и его сотрудниками в 1970 г. из штамма *Haemophilus influenzae*. Она была обозначена *Hin*dIII.

Известны три класса рестриктаз, различающихся между собой по характеру узнавания и разрыва ДНК, структуре белка и условиям, необходимым для осуществления реакции. В генно-инженерных работах используют ферменты второго класса, разрывающие двухцепочечную ДНК в зоне участка узнавания. Обычно фермент распознает специфичную последовательность из 4–6 пн, являющуюся палиндромом, и разрезает ее в середине или несколько в стороне. В последнем случае образуются выступающие одноцепочечные концы, получившие название «липких». Такие концы, сформировавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут гибридизоваться между собой в силу комплементарности оснований. Это обеспечивает возможность последующего объединения различных молекул ДНК.

Примером рестриктаз, образующих «липкие» концы, являются широко используемые в генно-инженерных работах ферменты *Eco*RI и *Bam*HI. Первая из них кодируется *R*-плазмидой, присутствующей в штамме *E. coli*, вторая обнаружена в клетках *Bacillus amyloliquefaciens*. Примером рестриктаз, образующих полностью двунитевые («тупые») концы, служит *Hae*III, выделенная из штамма *Haemophilus aegyptium* (рис. 7.6).

Ферменты рестрикции обозначают по названию организма, из которого они изолированы. Используют три буквы из названия вида бактерии, например, *Bgl*II — из *Bacillus globigi*, *Eco*RI — из *E. coli*, *Hin*dIII — из *Haemophilus influenzae*. После трех букв курсивом следуют определенный буквенный символ, обозначающий генетическую линию или штамм, и римская цифра.

В настоящее время известно более 400 рестриктаз, способных расщеплять ДНК в общей сложности почти по 120 различающимся последовательностям.

Дополнение 7.3

В 1978 г. В. Арбер (W. Arber), Д. Натанс (D. Nathans) и Х. Смит (H. Smith) получили Нобелевскую премию за открытие ферментов рестрикции и их применение в молекулярной генетике.

Среди эукариот специфические эндонуклеазы обнаружены у дрожжей родов *Saccharomyces* и *Pichia*.

Литература к разделу 7.4.1

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 413–415.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 448–452.

7.4.2. Векторы для молекулярного клонирования

Вектор — это молекула ДНК, переносящая клонируемый фрагмент ДНК. Любой вектор должен обеспечивать стабильное наследование рекомбинантных ДНК в автономном состоянии. Кроме того, вектор может иметь дополнительные характеристики, облегчающие генно-инженерные процедуры, например, содержать маркер, инактивирующийся при встройке в него чужеродной ДНК.

Векторные системы для молекулярного клонирования обычно создаются на основе репликонов плазмид и бактериофагов.

7.4.2.1. Плазмидные векторы

Плазмида, используемая в качестве вектора при клонировании в бактериальной клетке, должна включать следующие элементы:

1) сайт *ori* (участок инициации репликации) для нормальной репликации ДНК и размножения плазмиды в клетке данного вида бактерий;

2) доминантный селективный маркер, который позволяет отобрать клетку, несущую плазмиду со встроенным фрагментом чужеродной ДНК;

3) уникальный сайт рестрикции, т. е. встречающийся в векторе единственный раз.

Хорошо известные плазмидные векторы (*pBR322* и *pUC9*) ведут свое начало от небольшой плазмиды *ColE1*, реплицирующейся в клетках *E. coli* независимо от хромосомы и существующей в числе 10–20 копий на клетку. В определенных условиях выращивания бактерий можно добиться избирательной амплификации этих плазмид, в результате чего они образуют до 1000 копий на клетку. Плазмида *pBR322* имеет гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (Ap^r) и тетрациклину (Tc^r). В гене Tc^r имеется уникальный сайт, разрезаемый рестриктазой *Bam*HI (рис. 7.7).

Рисунок 7.7

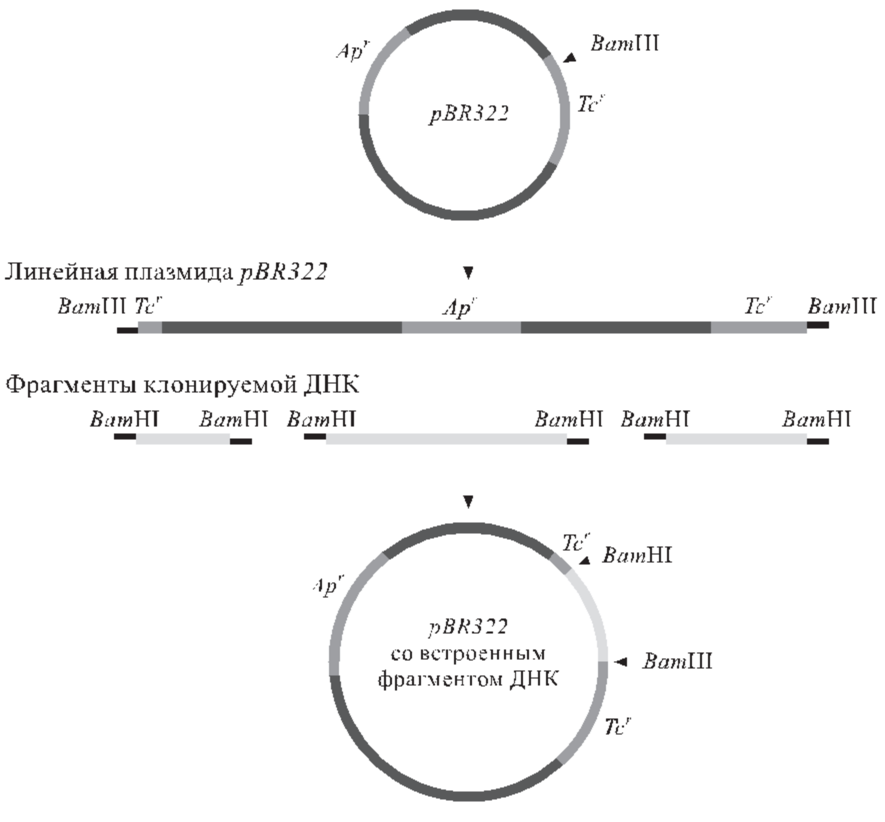


Схема встраивания клонируемых фрагментов ДНК в плазмиду *pBR322*

Рисунок 7.8

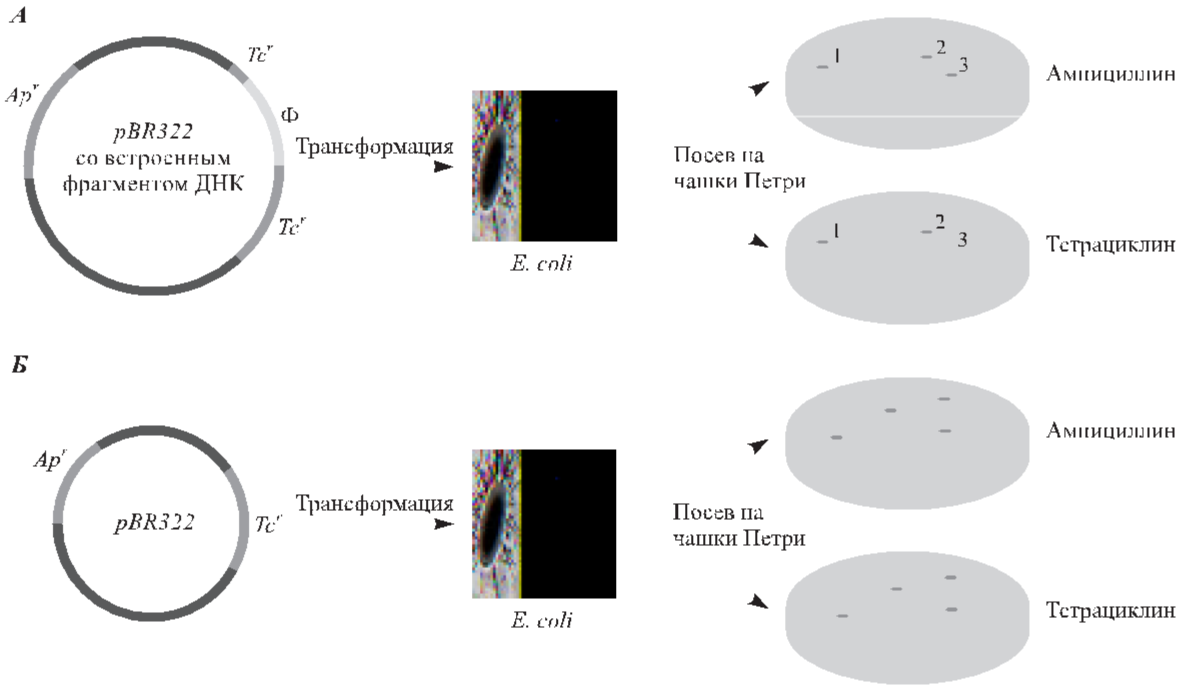


Схема выявления плазмид, содержащих встройку клонируемых фрагментов ДНК.

А. Встройка фрагмента Ф в ген Tc^r нарушает его активность, и бактерия теряет устойчивость к тетрациклину. После трансформации клеток *E. coli* плазмидами и последовательного посева этих бактерий на газон с ампициллином и тетрациклином колонии образуются только у трансформантов, имеющих плазмиду. Если клонируемый фрагмент встроился в ген Tc^r, эти колонии (3) будут отсутствовать на среде с тетрациклином. Бактерии из колонии 3 с ампициллинового газона собирают для опытов.

Б. Одинаковое расположение колоний на обоих газонах свидетельствует об отсутствии встройки чужеродной ДНК в плазмиду

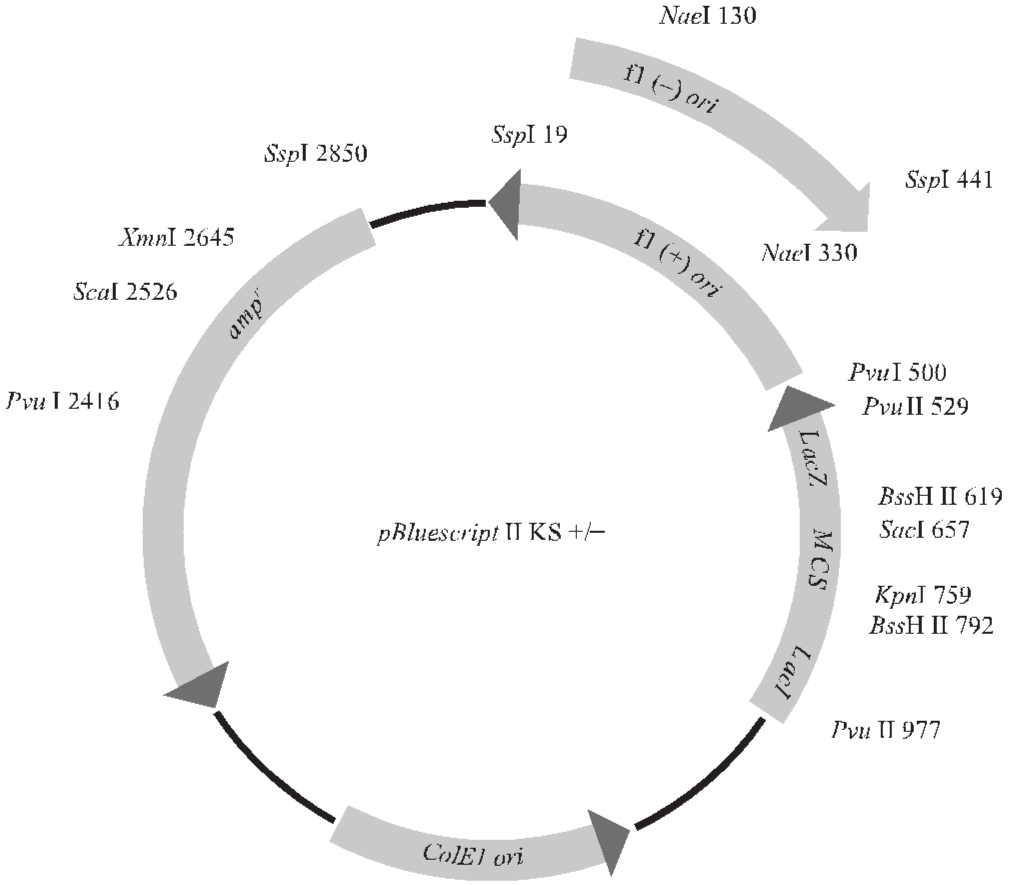
После обработки ДНК плазмиды рестриктазой *Bam*HI получается линейная ДНК, имеющая специфичные «липкие» концы. Ее смешивают с фрагментами клонируемой ДНК (обработанной также *Bam*HI), имеющими те же «липкие» концы. Отжиг и обработка ДНК-лигазой приводит к образованию плазмиды, содержащей встройку чужеродной ДНК, причем максимальный размер встройки ДНК в эту плазмиду составляет 10 тпн.

Как и сам процесс встраивания фрагмента в плазмиду, так и трансформация плазмиды в *E. coli* являются процессами статистическими, в результате которых могут образоваться три типа клеток: не содержащие плазмиду, содержащие плазмиду без встройки, содержащие плазмиду со встройкой. Чтобы выбрать клетки, несущие плазмиды со встроенными последовательностями ДНК, используют специальную схему (рис. 7.8).

Широко используется в качестве вектора плазмида *pBluescript* II KS(+/–). Эта кольцевая молекула, имеющая длину 2961 пн, создана на основе другой плазмиды — *pUC19*. У плазмиды *pBluescript* (рис. 7.9) число копий достигает 100 на клетку, селекционным маркером является ген резистентности к ампициллину (Ap^r), она содержит целый ряд уникальных сайтов рестрикции, собранных в одном районе. Такие участки называют полилинкерными или участками множественного клонирования (multiple cloning site, MCS). В плазмиде *pBluescript* участок MCS длиной около 200 пн содержит до 20 сайтов рестрикции и расположен в районе 5'-конца гена *lacZ*. Плазмиды культивируют в клетках с мутантным проявлением гена *lacZ*. Поэтому нормальная активность данного гена достигается за счет работы его в плазмиде. В результате инсерции чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена *lacZ* и в плазмиде. Колонии бактерий, содержащих нормальный и мутантный гены, легко различаются, если поместить клетки на субстрат X-gal, который разрушается β-галактозидазой (продукт гена *lacZ*) с выпадением нерастворимого в воде осадка, окрашенного в синий цвет.

Клетки, в которых произошла трансформация плазмидой, отбирают по их способности

Рисунок 7.9



Плазмида *pBluescript* II KS (+/–)

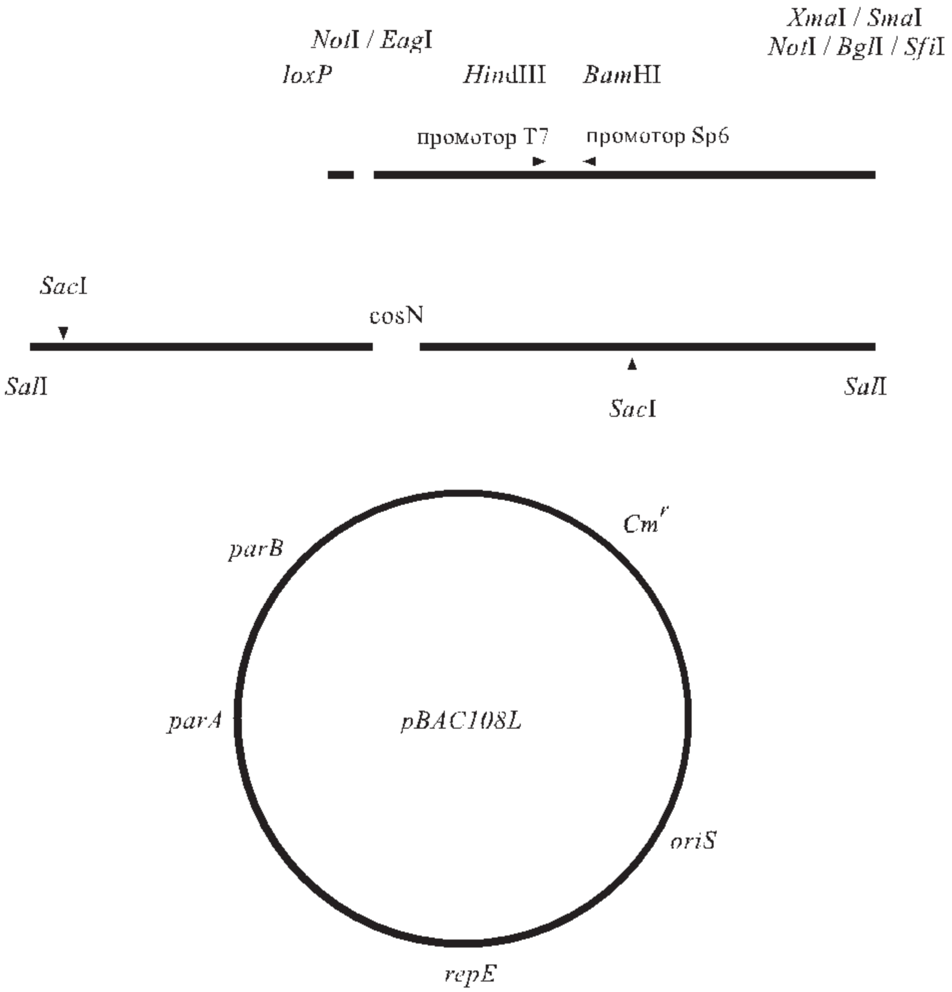
жить на среде с ампициллином. Те клетки, которые содержат плазмиды со встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Если колонии окрашены в синий цвет, значит, в этих клетках плазмиды не содержат встройки.

Бактериальные искусственные хромосомы (BAC — bacterial artificial chromosome) приготовлены на основе *F*-плазмиды *E. coli* [Shizuya et al., 1992]. Эта плазмида (рис. 7.10) имеет гены, которые контролируют не только репликацию ее ДНК, но и число копий в клетке. Регуляторные гены включают *oriS*, *repE* (контроль однонаправленности репликации *F*-фактора), *parA* и *parB* (поддержание числа копий на уровне 1–2 на клетку *E. coli*). Кроме того, в плазмиде есть гены резистентности к хлорамфениколу (Cm^r) и сегмент клонирования. Последний включает сайты бактериофагов *λcosN* и P1*loxP* (эти два сайта дают возможность получения концов, используемых для построения рестрикционных карт), два сайта инсерции (*Hin*dIII и *Bam*HI), а также несколько C–G-богатых сайтов рестрикции (*Not*I, *Eag*I, *Xma*I, *Sma*I, *Bgl*I и *Sfi*I). Размер клонируемого фрагмента составляет около 300 тпн. Наличие колоний клеток, содержащих инсерцию, определяется по гибридизации на фильтрах с клонируемой ДНК.

Плазмиды иногда встречаются у эукариот, однако большинство из них не проявляется в фенотипе и обнаруживается только с помощью молекулярных методов. Наиболее известно так называемое 2-микронное кольцо (2*μ*-circle) у дрожжей. Эту плазмиду также можно использовать в качестве вектора при клонировании (см. разд. 8.3.2.2).

Для переноса генов используют также плазмиды почвенных бактерий: *Ti*-плазмиду *Agrobacterium tumiferaciens* и *Ri*-плазмиду *Agrobacterium rhizogenes*. Эти бактерии поражают до 60 % двудольных растений и некоторые однодольные растения, вызывая формирование опухолей — корончатых галлов (*A. tumiferaciens*) или образование «косматых корней» (*A. rhizogenes*). Трансформирующими факторами у этих бактерий являются большие плаз-

Рисунок 7.10

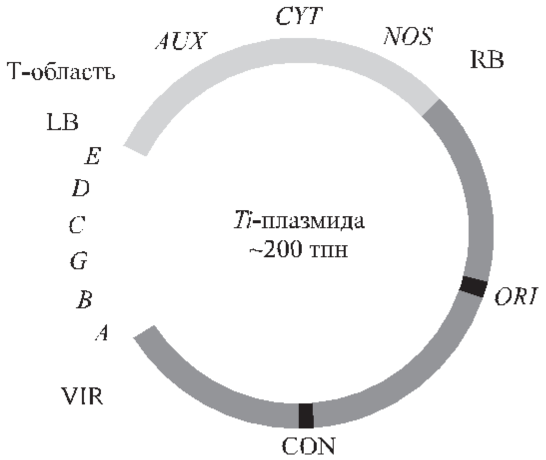


Строение плазмиды *pBAC108L* [Shizuya et al., 1992]

миды — *Ti* (от англ. tumor inducing) или *Ri* (root inducing). *Ti*-плазмида — это кольцевая ДНК, аналогичная плазмиде *pUC19*, но отличающаяся от нее гигантскими размерами (примерно 200 тпн против 2,69 тпн у *pUC19*). Она содержит ориджин репликации, Т-область (Т — transfer), которая выделяется из плазмиды и переносится в ядро клетки, два повтора длиной по 25 пн, называемых левой и правой (LB и RB) границами Т-области, район VIR (virulence), содержащий шесть генов, контролирующих процесс встраивания Т-области в геном хозяина, и ряд других генов (рис. 7.11). Для успешного встраивания трансгена в геном хозяина необходим только участок, расположенный между повторами LB и RB, и все остальные функции остаются в собственно плазмиде. Поэтому механизм трансформации оказался довольно простым, и на основе *Ti*-плазмиды создано много различных векторов. В качестве селективных маркеров в Т-область вводят гены устойчивости к антибиотикам (канамицину, карбенициллину) или гербицидам.

При взаимодействии инфицирующей бактерии с поврежденным участком растения индуцируется VIR-область, в результате активности которой появляются одноцепочечные надрезы в пределах пограничных областей плазмиды, сначала в правой (RB), затем — в левой (LB). Образуется одноцепочечная молекула Т-ДНК, переносимая из бактерии в ядро растительной клетки и встраиваемая в ее хромосому посредством механизма, аналогичного процессу бактериальной конъюгации (см. гл. 5). Таким образом растение приобретает трансген, встроенный в Т-участок плазмиды. Наличие маркерных генов позволяет легко отобрать трансформированные клетки или растения на средах, содержащих соответствующие антибиотики или гербициды [Russell, 1998; Першина, 2000].

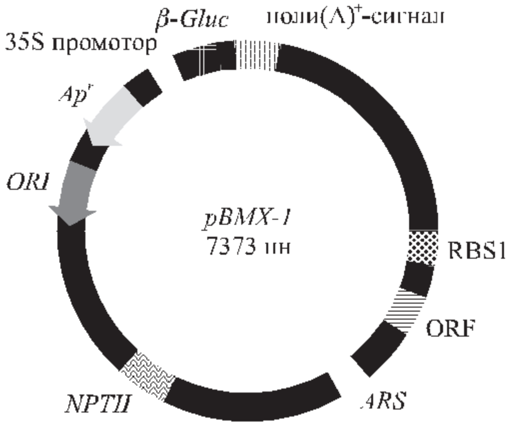
Рисунок 7.11



Ti-плазмида [Першина, 2000. С. 58].

Т-область — ДНК плазмиды, переносимая в ядро клетки растения; LB и RB — левая и правая границы Т-области; *AUX* и *CYT* — гены, контролирующие синтез ауксина и цитокинина в трансформированной клетке и индуцирующие рост опухолевых клеток; *NOS* — ген, контролирующий синтез нопалина (источника углерода, азота и энергии в трансформированной клетке); VIR, CON и *ORI* — области вирулентности, конъюгации и независимой репликации

Рисунок 7.12



Генетическая карта вектора *pBMX-1*, построенного на основе митохондриальной плазмиды [Таусон и др., 1999].

β-Gluc — ген *β*-глюкуронидазы; RBS1 — сайт связывания рибосом (участок митохондриальной плазмиды 1,9 тпн); ORF — открытая рамка считывания митохондриальной плазмиды 1,9 тпн; *ARS* — участок инициации репликации митохондриальной плазмиды 1,9 тпн; *NPTII* — ген неомицинфосфотрансферазы; *ORI* — ориджин репликации бактериальной плазмиды *pUC18*; Ap^r — ген ампициллин-резистентности

Характерной особенностью митохондриальных геномов многих высших растений, таких как пшеница, сорго, просо, подсолнечник, сахарная свекла, кукуруза, является присутствие в их составе, помимо основной высокомолекулярной ДНК, видоспецифичных наборов кольцевых и (или) линейных автономно реплицирующихся молекул плазмидоподобных ДНК (ппДНК). Например, у кукурузы сорта «Черный мексиканец» в митохондриях находят основную кольцевую молекулу размером около 570 тпн, а также мини-линейную и мини-кольцевые ДНК размерами 2,3 тпн и 1,9 и 1,4 тпн соответственно.

Интактные митохондрии и митохондриальные ДНК можно использовать в качестве векторной системы в экспериментах по переносу генов в клетки животных и растений. Один из векторов, разработанных на основе мини-кольцевой ппДНК, показан на рис. 7.12.

7.4.2.2. Фаговые векторы

Наиболее часто используемые фаговые векторы являются производными фага λ. Левое и правое плечи фага имеют все гены, необходимые для литического цикла; напротив, гены, контролирующие лизогению и расположенные между плечами, удалены. Такие модифицированные фаги проходят литический цикл, но лизогения не происходит. Между двумя плечами помещается заменяемый фрагмент ДНК, который не нужен для развития фага (рис. 7.13). На стыке заменяемого центрального фрагмента и каждого из плеч находится один и тот же сайт рестрикции, например *Eco*RI. Другого такого сайта в плечах данного фага нет. В ходе клонирования ДНК фага и клонируемый фрагмент ДНК обрабатывают рестриктазой *Eco*RI, затем смешивают, отжигают и лигируют стыки цепей.

В частицу фага λ может упаковаться ДНК длиной 37–52 тпн, на плечи приходится около 30 тпн, т. е. размер вставки может быть 7–22 тпн, в среднем около 15 тпн. Фаги без вставок или, напротив, со слишком большими вставками не развиваются и не поражают бактерии. На газонах *E. coli* выедаются так называемые бляшки (plaques) фагами, имеющими вставки нужного размера.

Некоторые бактериофаги имеют относительно большие геномы, что позволяет внедрить в них крупные фрагменты чужеродной ДНК. У одного из таких фагов, P1, геном размером 110–115 тпн упаковывается в белковую оболочку. В генно-инженерных опытах компоненты P1 включают в кольцевую плазмиду (рис. 7.14). После этого плазмидный вектор P1 разрезают на 2 плеча, в которых лигируют до 100 тпн чужеродной ДНК. Затем рекомбинантный фаг поглощается подходящей клеткой-хозяином.

Рисунок 7.13

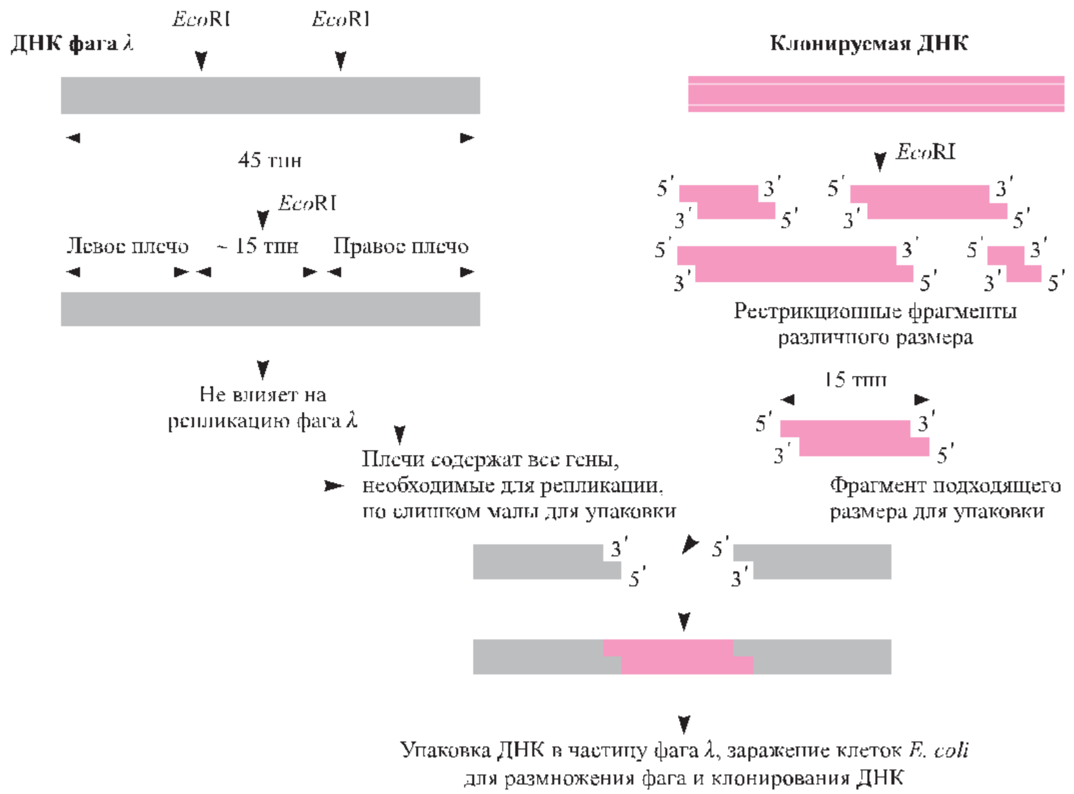


Схема клонирования ДНК с использованием фага λ в качестве вектора [Russell, 1998. P. 456]

Рисунок 7.14

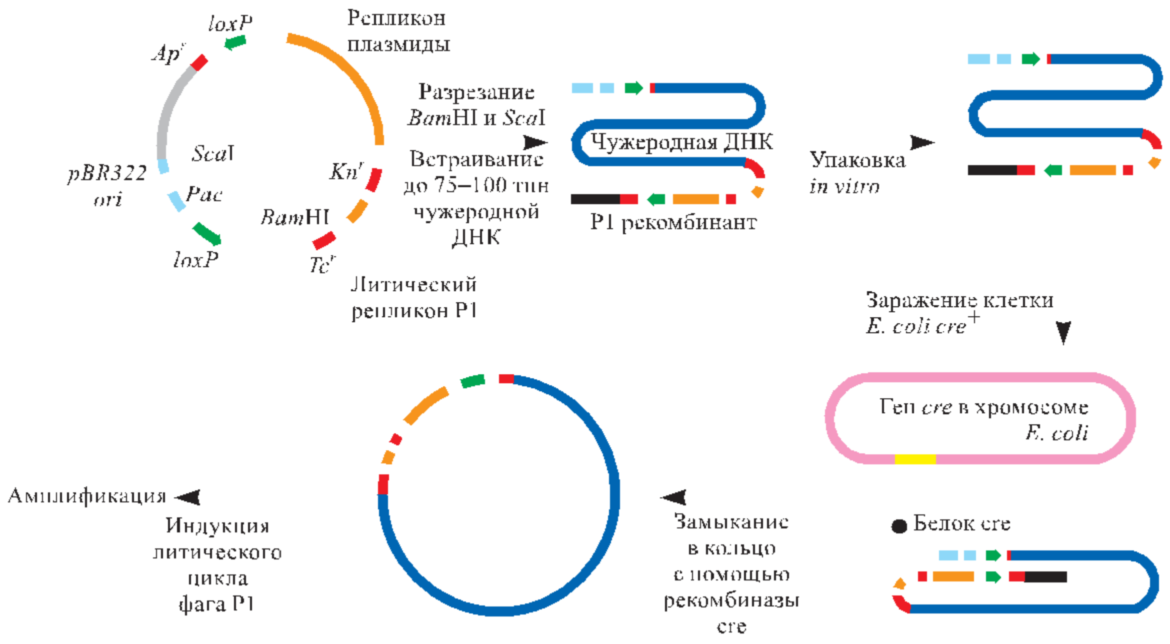
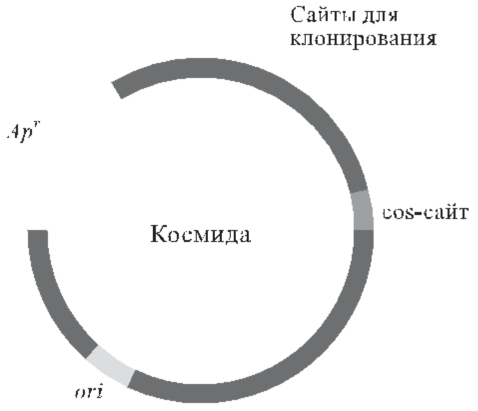


Схема клонирования в векторе фага P1.

Плазмида *P1* содержит различные элементы генома P1: *Pac* — сайт упаковки, два сайта *loxP* (опознаются фаговой рекомбиназой, кодируемой геном *cre*). Вектор разрезается так, что получаются 2 плеча: короткое и длинное, в которое лигируются 75–100 тпн ДНК. Упаковка рекомбинантной ДНК происходит *in vitro* с использованием упаковочных экстрактов P1: pacase расщепляет рекомбинантную ДНК в сайтах *Pac*

Рисунок 7.15



Космидный вектор для клонирования [Russell, 1998. P. 456]

7.4.2.3. Космидные векторы

Космиды в природе не встречаются, они созданы искусственно в результате комбинации плазмид и фага λ. Космида имеет последовательность *ori*, позволяющую ей реплицироваться в *E. coli*, доминантный селекционный маркер Ap^r и уникальные сайты рестрикции для инсерций и клонирования фрагментов ДНК (рис. 7.15). Кроме этого космиды имеют cos-сайт, происходящий из фага λ. Cos-сайты — это участки, в которых многочисленные копии геномов λ-фага, объединенные в длинную цепь, называемую конкатамером, разрезаются на фрагменты длиной 48 тпн, пакуемые в фаговые головки. Cos-сайты фага λ введены в плазмиду, в результате получаются небольшие космиды размером около 5 тпн. Когда фрагменты ДНК размером 35–47 тпн встраиваются в такую космиду, молекула достигает нужной длины, чтобы упаковаться в фаговую частицу. Этот фаг затем вводится в клетку *E. coli*.

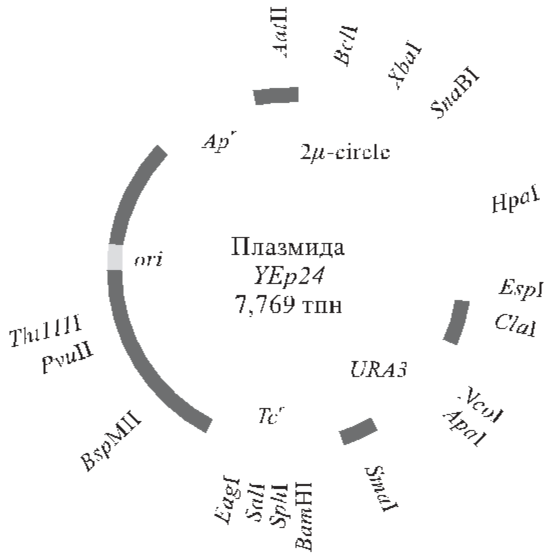
Размер клонируемого фрагмента ДНК в космидном векторе составляет 35–45 тпн.

7.4.2.4. Челночные векторы

Это векторы, которые способны реплицироваться в двух и более организмах-хозяевах.

Плазмида *YEp24* (рис. 7.16), способная размножаться в клетках дрожжей и *E. coli*, имеет последовательность *ori*, позволяющую реплицироваться в *E. coli,* и селекционные маркеры Ap^r, Tc^r (*E. coli*) и *URA3* (контроль биосинтеза урацила для клеток дрожжей), а также последовательность 2μ-circle, специфичную для дрожжей и позволяющую реплицироваться автономно в дрожжевой клетке.

Рисунок 7.16



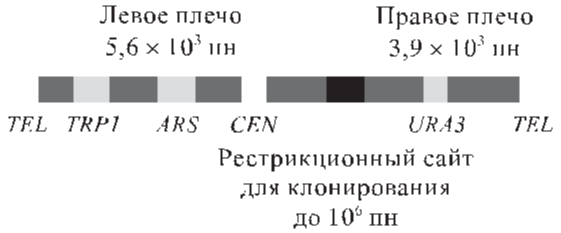
Челночный вектор *YEp24* между клетками *E. coli* и дрожжей [Russell, 1998. P. 457]. Показаны уникальные сайты рестрикции

7.4.2.5. Искусственные хромосомы дрожжей (YAC)

Векторы этого типа имеют следующие элементы: 1) теломеры на каждом конце; 2) центромерные последовательности (*CEN*); 3) селекционные маркеры на каждом плече (*TRP1* и *URA3* — независимость от наличия триптофана и урацила соответственно); 4) автономно реплицирующиеся последовательности — *ARS*, позволяющие реплицироваться в дрожжевой клетке; 5) рестрикционные сайты, уникальные для участков YAC и пригодные для инсерций ДНК (рис. 7.17).

Клоны ДНК вводятся в клетки дрожжей трансформацией. Отбирая по маркерам *TRP1* и *URA3*, можно быть уверенным, что данный клон имеет и левое, и правое плечо вектора.

Рисунок 7.17



Структура YAC-вектора [Russell, 1998. P. 458]

Размеры клонируемых последовательностей ДНК велики: обычно несколько сот тысяч пар нуклеотидов и даже больше.

Литература к разделу 7.4.2

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 420–425.

Дейнеко Е. В. О потенциальных возможностях использования Т-ДНК почвенных бактерий // Вестн. ВОГиС. 1998. N 4. С. 12–14.

Лутова Л. А. и др. Генетика развития растений. СПб.: Наука, 2000. С. 395–436.

Першина Л. А. Методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений: В 2 ч. Ч. 2. Новосибирск: Изд. Новосиб. гос. ун-та, 2000. 69 с.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 454–492.

Shizuya H., Birren B., Kim U.-J. et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 8794–8797.

7.4.3. Создание геномных библиотек

Коллекция клонов ДНК, содержащая хотя бы по одному экземпляру каждого из фрагментов ДНК, входящих в состав генома данного вида, называется геномной библиотекой.

Аналогичные коллекции, полученные из индивидуальных хромосом или их частей, называют хромосомными библиотеками.

Получение геномных библиотек включает выделение тотальной ДНК, фрагментацию ее с помощью рестриктаз, присоединение полученных фрагментов к векторным молекулам (плазмидного или фагового происхождения) и введение рекомбинантных ДНК в реципиенские бактерии. Известно три подхода, применяемых при создании геномных библиотек:

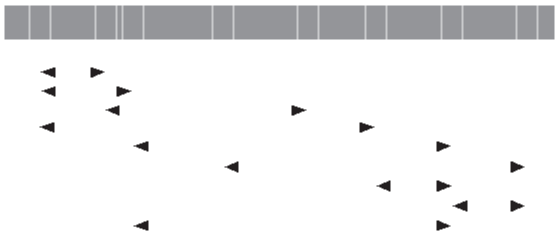
1. Геномная ДНК полностью переваривается рестриктазой и затем заключается в клонирующий вектор. Недостатком этого метода является то, что размеры клонируемых инсерций довольно малы: около 4 тпн.

2. ДНК фрагментируется механическими воздействиями (обработка ультразвуком, пропускание через иглу шприца), что позволяет получить более крупные фрагменты — 20–150 тпн, однако из-за отсутствия у них «липких» концов необходимы дополнительные манипуляции.

3. Применяется частичное переваривание рестриктазами. Это означает, что только часть имеющихся сайтов рестрикции используется ферментом для разрезания (рис. 7.18).

Эта техника позволяет получить набор клонов бактерий или рекомбинантных фагов, различающихся по включенным фрагментам ДНК.

Рисунок 7.18



Получение серии перекрывающихся фрагментов с одинаковыми «липкими» концами путем частичного переваривания ДНК рестриктазами. Вертикальными линиями помечены рестрикционные сайты, стрелками — фрагменты ДНК

Первую геномную библиотеку создали Т. Маниатис с сотрудниками в 1978 г. Они использовали ДНК из генома *D. melanogaster*, которую клонировали в клетках *E. coli*.

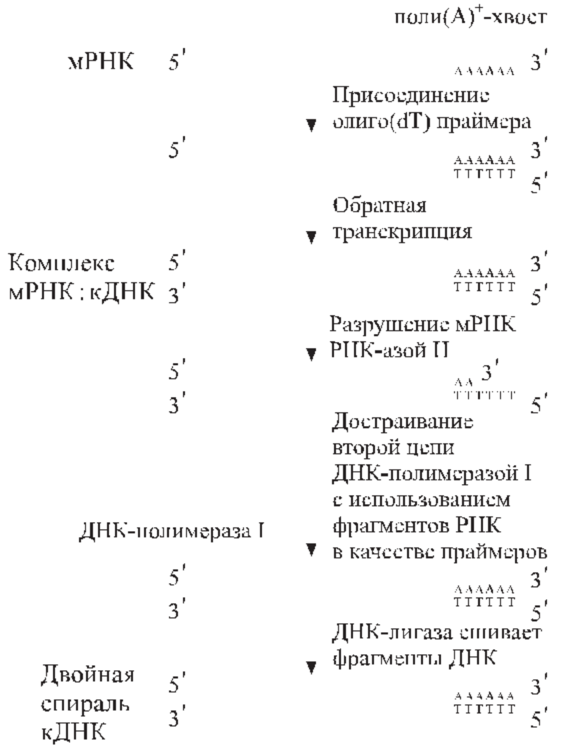
Копии ДНК, комплементарных РНК (комплементарная ДНК, кДНК, или cDNA), могут составлять библиотеку кДНК. Поскольку библиотека кДНК отражает спектр генной активности в клетках, из которых была выделена РНК, создание и анализ таких библиотек особенно полезны для сравнения генной активности в клетках разных типов. Следует также учитывать, что клоны в библиотеке кДНК представляют зрелые, т. е. прошедшие процессинг, мРНК. Они не содержат интронов.

У эукариот только мРНК содержат поли(А)$^+$-хвосты. Используя это качество, мРНК выделяют. Затем в системе *in vitro* к этой мРНК добавляют короткую цепь олиго(dT), которая после отжига служит в качестве праймера для действия обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы), синтезирующей комплементарную цепь ДНК на молекуле мРНК (происходит как бы обратная транскрипция: РНК → ДНК). Далее с помощью РНК-азы Н, ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы удаляется цепь РНК, на ее месте синтезируется новая ДНК-цепь, фрагменты которой лигируются (рис. 7.19).

После того как молекулы кДНК синтезированы, их готовят для клонирования. К молекулам кДНК с помощью ДНК-лигазы фага Т4 добавляют линкерную ДНК — относительно короткий двунитчатый фрагмент длиной 8–12 пн (рис. 7.20). Линкер содержит сайт узнавания одной из рестриктаз. По этому сайту клоны кДНК лигируют с векторной ДНК.

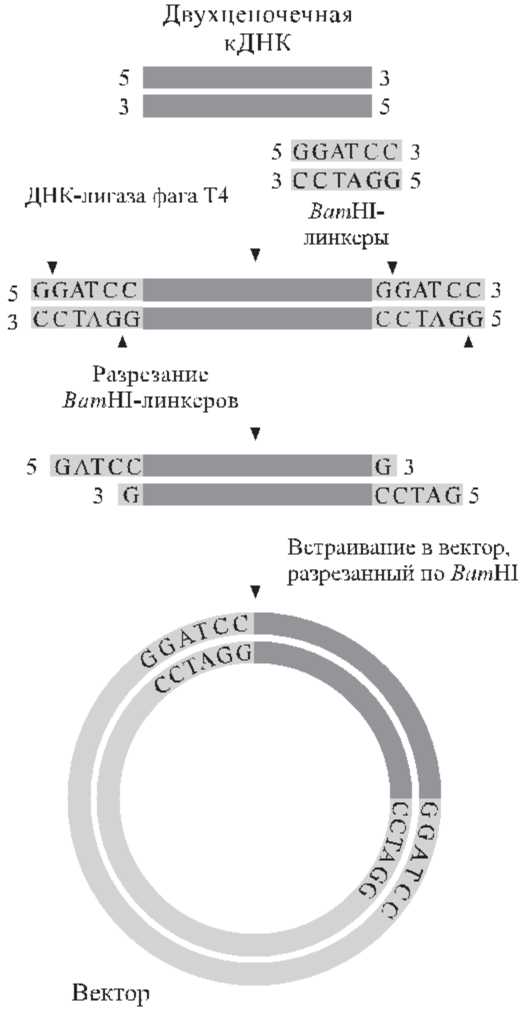
Для того чтобы выявить клоны, находящиеся в библиотеках, и выделить их, сущест-

Рисунок 7.19



Синтез двунитчатой комплементарной ДНК из поли(A)+-РНК с использованием обратной транскриптазы, РНК-азы H, ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы [Russell, 1998. P. 462]

Рисунок 7.20



Клонирование фрагментов кДНК с использованием линкеров, содержащих сайт рестрикции *Bam*HI [Russell, 1998. P. 463]

вуют различные способы, суть всех их состоит в скринировании библиотек. Рассмотрим, как скринируют библиотеки, т. е. анализируют и выделяют клоны, заключенные в λ-фагах (рис. 7.21). Сначала выращивают газон бактерий *E. coli*, на который помещают суспензию фагов, содержащих геномные клоны. В тех участках, где фаги инфицировали бактерии и размножились, образуется бляшка (plaque), т. е. как бы дырка на поверхности газона *E. coli*. Каждая бляшка состоит из большого числа потомков одиночной фаговой частицы, размножившихся в инфицированных и лизированных бактериях. Всякий раз, когда бактерия лизируется, освобождаются не только упакованные фаговые частицы, но и неупакованная фаговая ДНК.

На этот газон на несколько минут кладут мембранный фильтр, в результате чего ДНК из бляшки связывается с ним. Последующая обработка фильтра щелочным раствором приводит к денатурации ДНК на одиночные нити. После этого фильтры инкубируют с меченым зондом. Гибридизация меченого зонда с ДНК из бляшки выявляется в виде темного пятна засветки на фотопленке. По положению засвеченного пятна находят бляшку на газоне. Фаги с этой бляшки можно собрать и, инфицировав новые бактерии, размножить фаги, а следовательно, и клон до количеств, необходимых для молекулярного анализа.

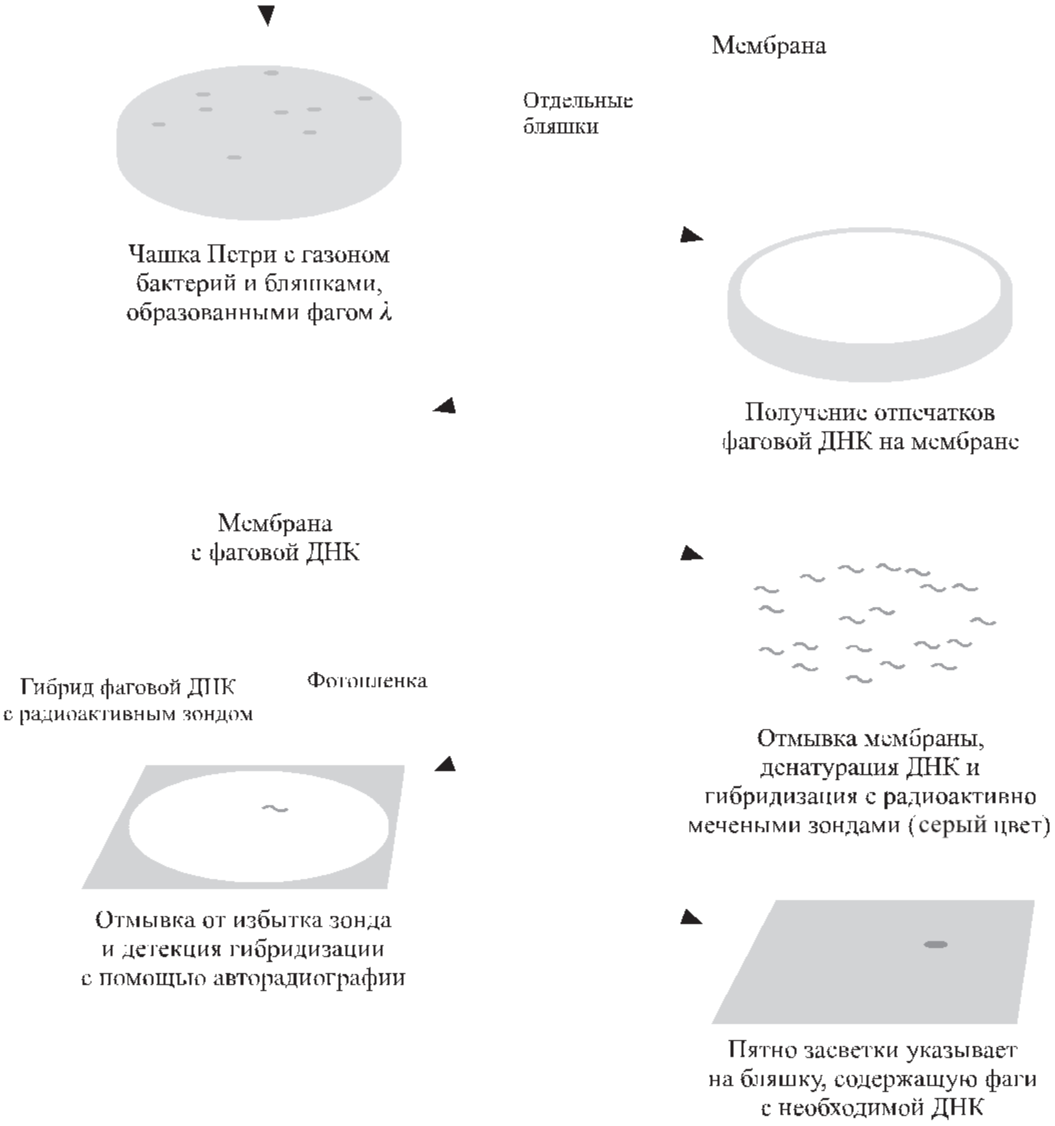
Литература к разделу 7.4.3

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 460–468.

7.4.4. Построение рестрикционных карт

Поскольку клонированные последовательности ДНК представляют собой гомогенную популяцию молекул ДНК, расщепление их под действием рестриктаз приводит к образованию более мелких дискретных фрагментов. С помо-

Рисунок 7.21



Скрининг библиотеки λ-фагов и выделение индивидуального фага, содержащего клон ДНК [Russell, 1998. P. 468]

щью специального анализа можно определить расположение рестрикционных фрагментов в молекуле ДНК, т. е. построить рестрикционную карту.

Существует несколько способов построения рестрикционных карт. Для того чтобы получить точную, детальную и полезную для работы карту, чаще всего не ограничиваются только одним из них. Наиболее употребительными являются следующие:

1. Одновременное расщепление ДНК несколькими рестриктазами.

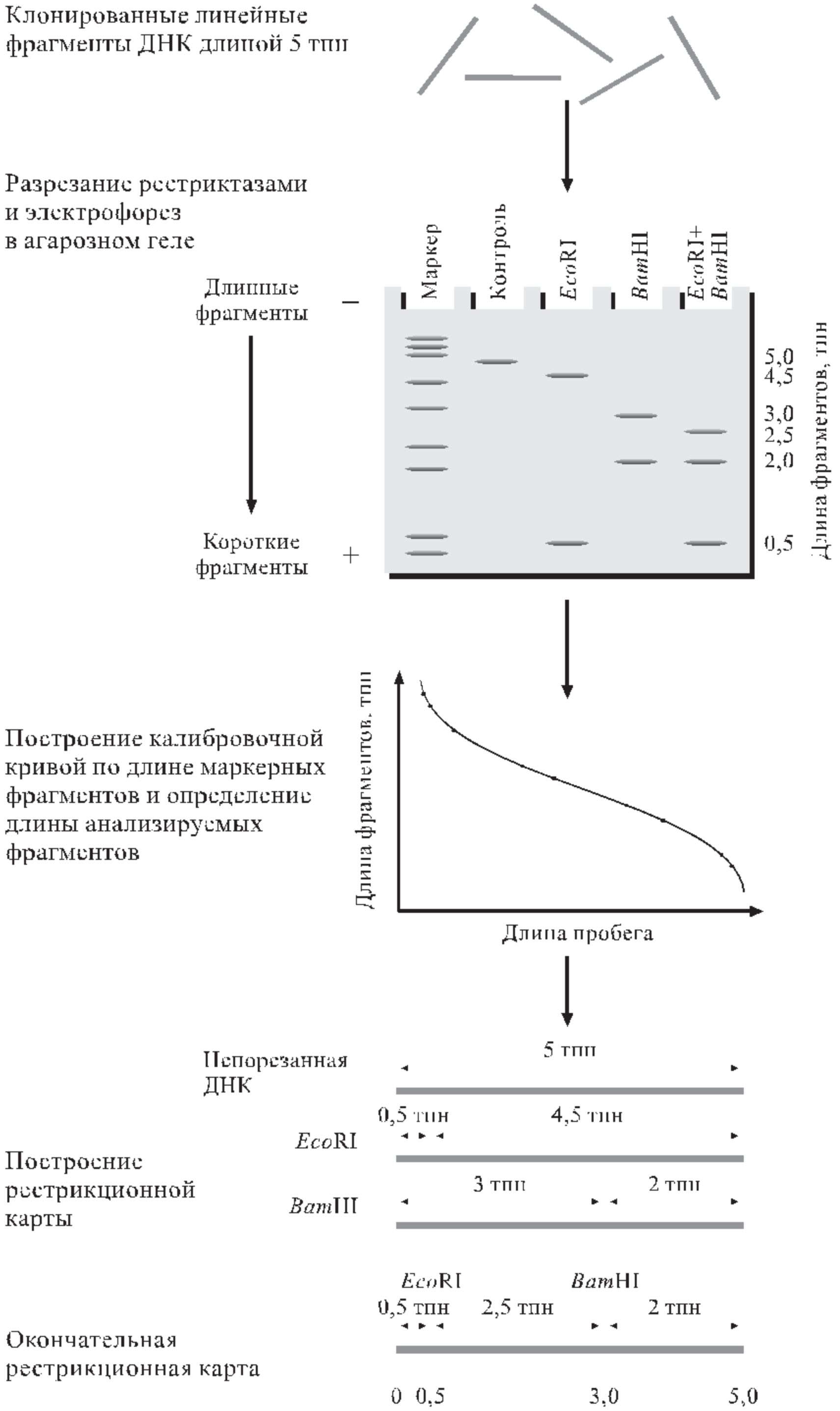
2. Последовательное расщепление выделенного рестрикционного фрагмента.

3. Частичное расщепление немеченой ДНК или ДНК, меченной по одному концу.

4. Частичное расщепление ДНК экзонуклеазами с последующим расщеплением рестриктазой.

Какой из этих методов использовать в каждом конкретном случае, зависит от многих причин. По размерам образующихся фрагментов ДНК удается определить относительное местоположение по крайней мере некоторых

Рисунок 7.22



Построение рестрикционной карты по сайтам рестриктаз *Eco*RI и *Bam*HI [Russell, 1998. P. 471]

участков расщепления. С увеличением числа парных комбинаций ферментов увеличивается число участков, локализация которых установлена, вплоть до получения окончательной картины. В результате получается карта рестрикционных сайтов.

Рассмотрим простейший пример рестрикционного картирования (рис. 7.22). Допустим, что был клонирован фрагмент ДНК длиной 5 тпн. Одну аликвоту ДНК обрабатывают рестриктазой *Eco*RI, другую — *Bam*HI, третью — смесью обеих рестриктаз. После электрофоре-

тического разделения фрагментов можно определить их размеры, сопоставляя с размерами известных фрагментов ДНК (маркеры размеров ДНК). После электрофореза гель окрашивают бромидом этидия и фотографируют в ультрафиолетовом свете. На фотографиях измеряют расстояния, пройденные тем или иным фрагментом от старта. Для маркеров с известным молекулярным размером также определяют расстояние, пройденное со старта, и строят калибровочную кривую. Затем на этой кривой находят положение каждого фрагмента по длине пройденного пути и определяют его размер. В конкретном случае (см. рис. 7.22) очевидно, что после обработки *Eco*RI появляются два фрагмента — 4,5 и 0,5 тпн. Это свидетельствует о наличии только одного сайта рестрикции, и этот сайт находится на расстоянии 0,5 тпн от одного из концов исходного фрагмента. По этой же логике есть только один рестрикционный сайт *Bam*HI, удаленный на 2 тпн от одного из концов. При совместном гидролизе двумя рестриктазами получаются три фрагмента: 2,5, 2,0 и 0,5 тпн. Расположить эти фрагменты непротиворечиво с данными, полученными при действии каждой из рестриктаз в отдельности, можно лишь так, как это сделано на окончательной рестрикционной карте.

В реальных экспериментах построение рестрикционных карт — гораздо более сложный процесс.

Литература к разделу 7.4.4

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 337–338.
Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 469–471.

7.4.5. Саузерн-блот анализ

Для картирования хромосомных перестроек на физической карте, определения положения гена, выявления повторов, «хромосомной ходьбы» и т. д. используется Саузерн-блот анализ, изобретенный Э. Саузерном в 1975 г. Для разделения фрагментов ДНК обычно используют электрофорез в агарозном геле. ДНК в геле денатурируют и к гелю прикладывают нитроцеллюлозный фильтр. ДНК переносится на фильтр, где фиксируется обработкой высокой температурой или ультрафиолетом. Эта процедура напоминает прикладывание промокательной бумаги к тексту с еще не высохшими чернилами (от англ. blotting — промокание). После ряда дополнительных процедур все фракции ДНК, разделившиеся в геле в результате электрофореза, оказались перенесенными на фильтр (рис. 7.23). Фильтр затем помещают в гибридизационный буфер, в котором находится зонд, меченный радиоактивным изотопом или химическим путем. Этот зонд свяжется с комплементарным участком ДНК. После промывки фильтра можно приступить к выявлению сигна-

Рисунок 7.23

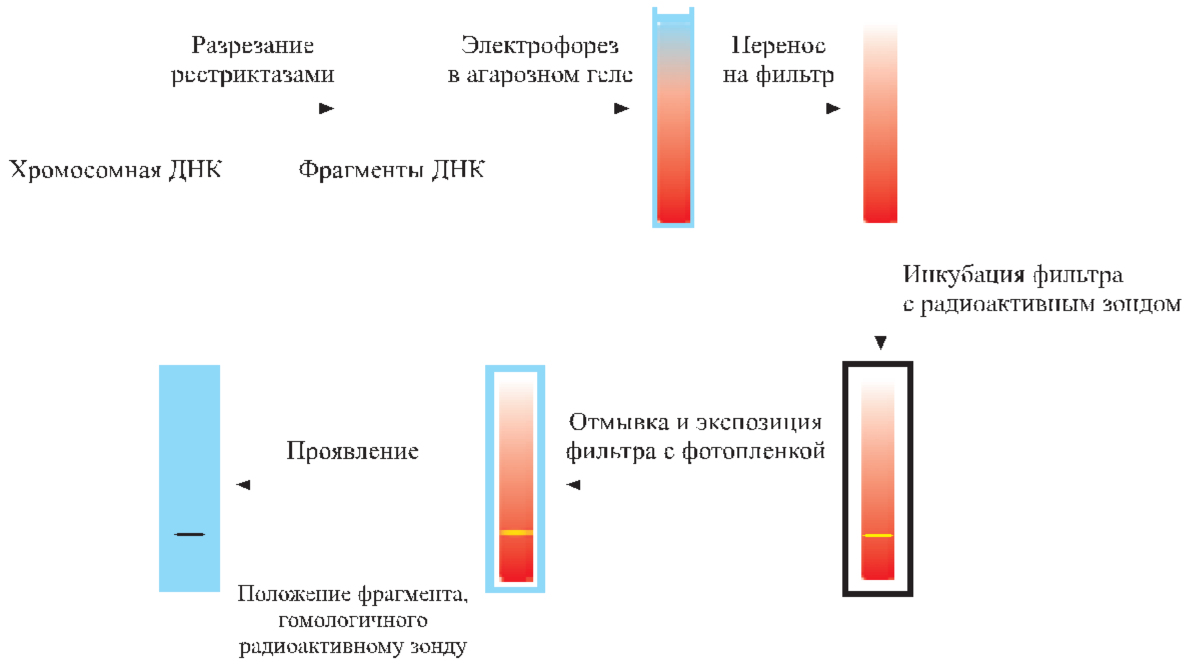
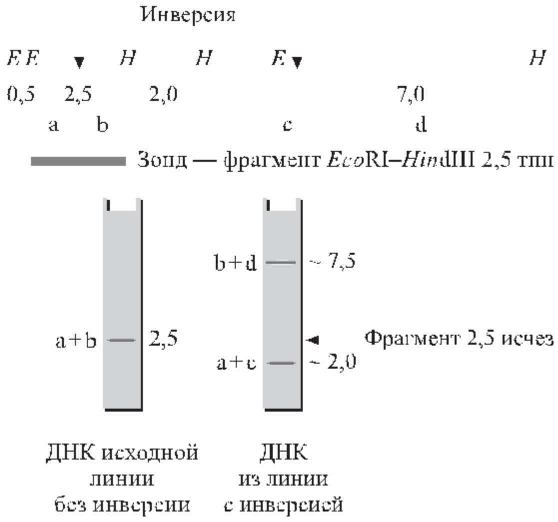


Схема Саузерн-блот гибридизации

Рисунок 7.24



Картирование точки разрыва инверсии на геномной карте ДНК с помощью Саузерн-блот гибридизации

ла. Если зонд был радиоактивным, к фильтру прикладывают рентгеновскую пленку и выявляют участок засветки. Если зонд мечен с помощью химических модификаторов, то детекцию проводят на том же фильтре.

Пример использования Саузерн-блота для картирования точки разрыва инверсии на карте ДНК представлен на рис. 7.24.

Литература к разделу 7.4.5

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 471.

7.4.6. «Хромосомная ходьба»

Процесс клонирования с помощью метода так называемой «хромосомной ходьбы» (walking), предложенного в 1979 г. В. Бендером, П. Спирером и Д. Хогнессом (W. Bender, P. Spierer, D. Hogness), позволяет получать длинные фрагменты (тракты) ДНК. Для начала «ходьбы» нужен специфический зонд, т. е. фрагмент ДНК из данного района хромосомы: это может быть ДНК гена или ДНК *P*-элемента при условии, что вследствие его инсерции в клонируемом гене индуцирована мутация.

«Ходьба» — это процесс идентификации прилежащих клонов в геномной библиотеке.

Процесс «ходьбы» включает следующие этапы:

1) получение исходного зонда;
2) поиск в геномных библиотеках;
3) выделение клона и построение рестрикционной карты;
4) выделение нового зонда и новый поиск в библиотеках.

Исходный клон ДНК должен быть каким-то способом получен. Меченый концевой кусок этого клона (1 на рис. 7.25) используют для скринирования библиотеки, сделанной на основе λ-фага или космид, и отбирают все рекомбинантные фаги. Как правило, отбирается несколько фагов (*а–г* на рис. 7.25). Поэтому, чтобы задать нужное направление движения при «ходьбе», все полученные клоны проверяют на наличие гомологии с одним из ближайших к концу фрагментов — 1' и отбирают только те рекомбинантные фаги, которые содержат клоны, гибридизующиеся с концевым фрагментом 1, но не с фрагментом 1'. Отобранный

Рисунок 7.25

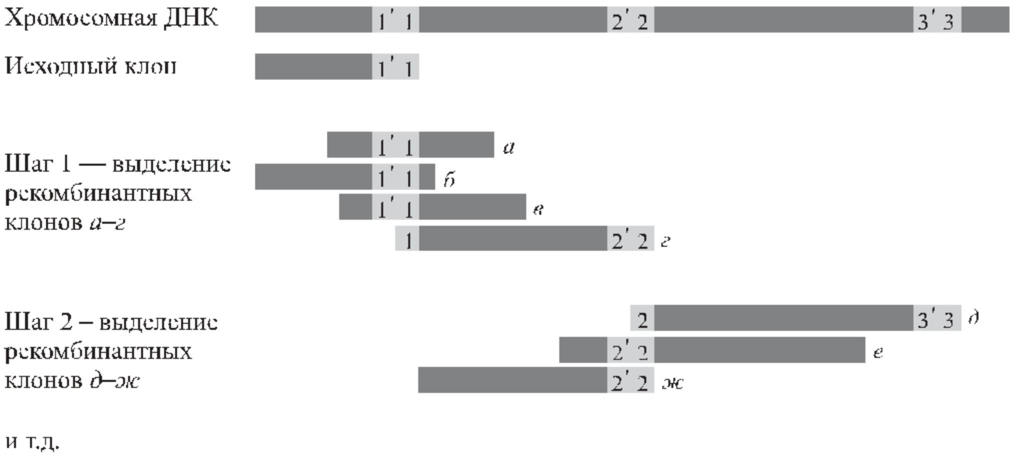


Схема «хромосомной ходьбы».
Объяснения в тексте

клон *г* гибридизуют *in situ* с хромосомами, чтобы удостовериться, что он в геноме располагается в том же месте, что и исходный клон. Затем строят рестрикционную карту клона *г* и вновь отбирают два концевых фрагмента — 2 и 2'. Используя этот клон как зонд, скринируют библиотеку. Из вновь полученных клонов отбирают только те, которые не имеют гомологии с фрагментом 2', т. е. клон *д*. Затем все повторяют с фрагментами 3 и 3' и т. д. С помощью «ходьбы» клонируют протяженные участки хромосомной ДНК. Известен случай, когда из генома дрозофилы клонировали до 800 тпн.

Из ограничений метода можно указать на огромные сложности клонирования в случае, если ДНК зонда содержит участок, гомологичный повтору, разбросанному по геному. При этом можно первый шаг сделать в одном участке хромосомы, а второй уже в другом — там, где локализована данная повторенная ДНК. Другим ограничением является небольшая длина каждого шага.

Литература к разделу 7.4.6

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 473.

7.4.7. Нозерн-блот анализ

Метод, похожий на Саузерн-блот, но применяющийся для анализа РНК, называется Нозерн-блотом (Northern-blot). Он был разработан в 1977 г. Д. Олвином, Д. Кемпом и Д. Старком (J. Alwine, D. Kemp, G. Stark). В данном случае молекулы РНК, выделенные из клетки, разделяются по размерам с помощью гель-электрофореза, затем переносятся на фильтр. После гибридизации с меченым одноцепочечным зондом выявляются сигналы в определенной области электрофореграммы, в которой обнаружена гомология РНК и ДНК зонда. Используя маркеры молекулярной массы, можно определить размер транскрипта какого-то гена.

Применяют Нозерн-блот в следующих типах экспериментов:

1) для определения размера специфических мРНК, кодируемых данным геном;

2) для выяснения того, присутствуют ли в данном типе клеток мРНК, считанные с данного гена, т. е. экспрессируется ген или нет;

3) для определения количества этой РНК и его изменения в развитии данного типа клеток.

Литература к разделу 7.4.7

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 473.

7.4.8. Полимеразная цепная реакция

Размножить определенный небольшой участок генома можно с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 7.26), который был изобретен в 1983 г. К. Мюллисом. Исходную молекулу ДНК прогревают, чтобы разрушить водородные связи, соединяющие комплементарные цепи. Затем реакционную смесь охлаждают в присутствии двух коротких (12–20 пн) фрагментов ДНК, один из которых комплементарен участку ДНК слева от изучаемого локуса, а второй — участку другой нити справа от изучаемого локуса. Эти фрагменты, называемые праймерами, связываются с соответствующими участками ДНК и задают точку начала синтеза новой комплементарной нити на матрице ДНК. Осуществляет этот синтез фермент ДНК-полимераза. В следующем цикле реакционную смесь с полученными нитями ДНК снова прогревают и вновь синтезированные нити ДНК используют в качестве матрицы. Новая порция праймеров связывается с соответствующими участками, и происходит новый цикл синтеза. В живой клетке ДНК-полимераза осуществляет редупликацию ДНК при делении клетки, т. е. полностью воспроизводит геномную ДНК. При проведении ПЦР синтезируется только небольшой фрагмент, расположенный между двумя праймерами. За 30 циклов число синтезированных фрагментов составит около 1 млрд.

Рисунок 7.26

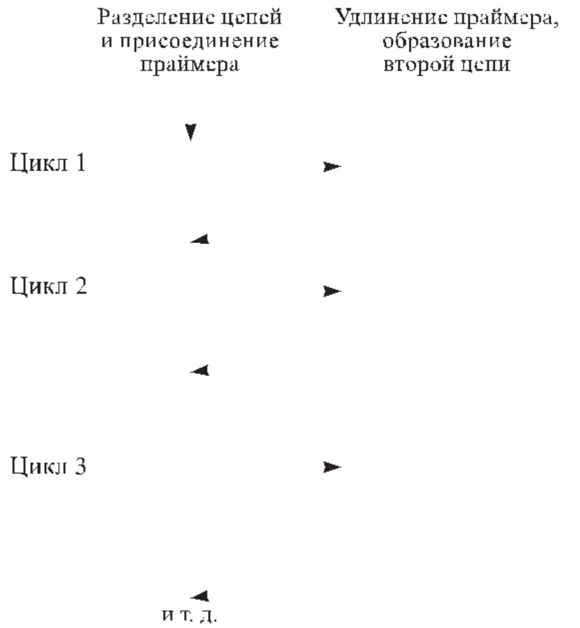
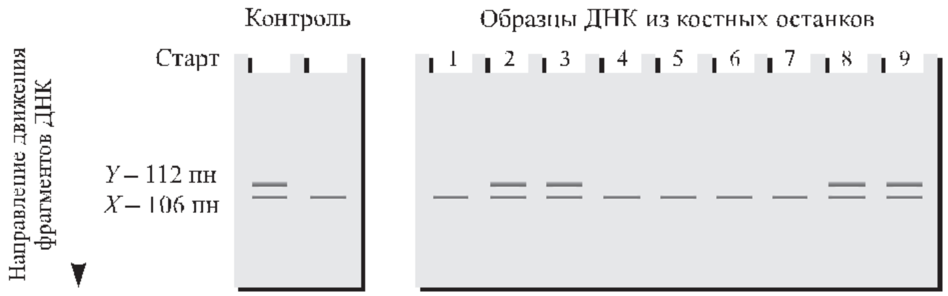


Схема полимеразной цепной реакции [Mullis, 1990. P. 64]

Рисунок 7.27



Определение половой принадлежности по анализу ДНК из костных останков [Янковский, 1996. С. 24]. Объяснения в тексте

Смесь прогревают при 94–95 °С, а охлаждают при 60 °С; эти температуры слишком высоки для того, чтобы обычная ДНК-полимераза нормально работала. Поэтому используют особый фермент (*Taq*-ДНК-полимераза), выделенный из бактерий *Thermus aquaticus*, которые живут в горячих источниках.

Метод ПЦР лежит в основе процедур идентификации личности, установления родства людей, в судебной медицине. Так, при расследовании убийства семьи последнего российского царя была использована ДНК из костных останков 9 человек в количествах, измеряемых ничтожными долями грамма: примерно по 20 пикограммов. Столько ДНК содержится примерно в 10 клетках.

Определение половой принадлежности по ДНК основано на том, что половые *X*- и *Y*-хромосомы человека несут гомологичный ген, находящийся в них в двух аллельных состояниях. Этот ген кодирует компонент зубной эмали — амелогенин, в *Y*-хромосоме он на 6 пн длиннее, чем в *X*-хромосоме. Для того чтобы выявить, содержится ли в данном образце ДНК *Y*-хромосомы, из всей геномной ДНК анализировали лишь область амелогенинового гена, содержащую участок, различный в *X*- и *Y*-хромосомах. Размер этой области составляет одну тридцатимиллионную долю от всего генома.

Для определения размера полученных ПЦР-фрагментов их разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. На рис. 7.27 показаны результаты такого разделения фрагментов гена амелогенина после проведения ПЦР на ДНК из костных останков. На девяти дорожках справа — фрагменты анализируемой ДНК. Слева — две дорожки с контрольными образцами: фрагментами, синтезированными на геномной ДНК, выделенной из крови мужчины и женщины. У мужчин образуется два фрагмента: длиной 112 пн, соответствующий гену амелогенина в *Y*-хромосоме, и 106 пн, соответствующий этому же гену в *X*-хромосоме. У женщин имеется две *X*-хромосомы, каждая из которых дает фрагмент 106 пн. В исследованных девяти образцах в 4 случаях видны две полосы, а в 5 — одна полоса. Следовательно, среди убитых было 4 мужчины и 5 женщин. Именно столько женщин было в царской семье, расстрелянной в Екатеринбурге в июле 1918 г. [Янковский, 1996].

Дополнение 7.4

В 1993 г. К. Б. Мюллис (K. B. Mullis) получил Нобелевскую премию за разработку метода полимеразной цепной реакции.

Литература к разделу 7.4.8

Иванов П. Л. Молекулярно-генетическая индивидуализация человека: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. М., 1995.

Янковский Н. К. Молекулярно-генетические методы в руках детектива, или опыт исследования останков семьи последнего российского императора // Соросовский образовательный журн. 1996. № 2. С. 21–27.

Mullis K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction // Sci. Amer. 1990. April. P. 56–65.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 476–478.

7.4.9. Определение последовательности нуклеотидов (секвенирование)

В 70-х гг. были разработаны две методики определения последовательностей нуклеотидов в клонированных фрагментах ДНК. Одну предложили А. Максам (A. Maxam) и У. Гилберт (W. Gilbert), другую — Ф. Сэнгер (F. Sanger). Метод Сэнгера, используемый чаще, будет рассмотрен ниже.

Рисунок 7.28

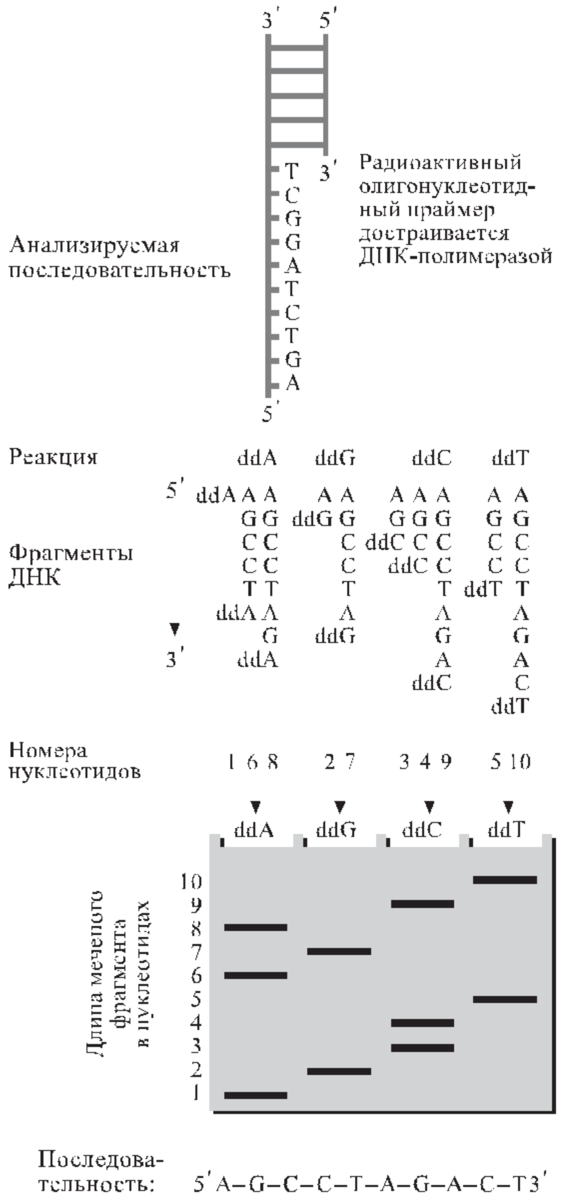


Схема опыта по определению последовательности нуклеотидов [Russell, 1998. P. 474]

ДНК денатурируют до однонитчатого состояния щелочной обработкой или нагреванием. Затем отжигают с одной из нитей короткий олигонуклеотидный праймер (рис. 7.28). Олигонуклеотид синтезируется таким образом, чтобы его 3'-конец был последним перед секвенируемой последовательностью. Олигонуклеотид служит праймером для достраивания цепи ДНК-полимеразой.

Для каждого эксперимента по секвенированию ставят четыре реакции с однонитчатой ДНК и прикрепленным к ней праймером. Каждая реакционная смесь содержит четыре нормальных предшественника ДНК: dATP, dTTP, dCTP и dGTP, а также ДНК-полимеразу (чаще используют ДНК-полимеразу фага T7). Предшественники метятся радиоактивно изотопами ^{32}P, ^{33}P или ^{35}S или нерадиоактивно. Реакции различаются присутствием того или иного модифицированного основания, называемого дидезоксинуклеотидом, поскольку у этих нуклеотидов в 3'-позиции находится H, а не OH, как у дезоксинуклеотидов. Дидезоксинуклеотид может включаться в растущую цепь ДНК, однако на этом синтез останавливается, поскольку отсутствие 3'-OH предотвращает образование фосфодиэфирной связи с последующим нуклеотидом. В каждой реакционной смеси присутствуют 4 нормальных dNTP и по одному ddNTP, в соотношении примерно 100 : 1. Таким образом, ДНК растет от праймера до того момента, когда в одну из позиций встраивается дидезоксинуклеотид. Поэтому среди продуктов реакции будет множество фрагментов, различающихся по длине, так как синтез их начинается с фиксированной точки (от праймера), а кончается в положении одного из нуклеотидов, соответствующих дидезоксинуклеотиду. В электрофорезе они разделяются, и последовательность легко определяется (см. рис. 7.28).

Литература к разделу 7.4.9

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 473–476.

7.4.10. Трансформация у дрозофилы

Трансформацией в генетике называют перенос генов из одного организма в другой. Трансформации у прокариот посвящен разд. 5.11. У эукариот трансформация в природе до сих пор не обнаружена. Что же касается экспериментальной передачи ДНК из одной клетки в другую, то на протяжении многих лет она у исследователей не получалась. Многие группы ученых азартно конкурировали друг с другом в конце 70-х — начале 80-х гг., пытаясь первыми осуществить перенос ДНК. Успехи были весьма редкими: молекулы ДНК, инъецированные микрохирургически в ранние эмбрионы некоторых видов млекопитающих, амфибий, морских ежей, иногда встраиваются в хромосомы клетки-хозяина. У дрозофилы искусственно введенная ДНК почти не включается в хромосомы эмбриона, хотя в культуре клеток типичная трансформация (или, как говорят, трансфекция) происходит довольно часто. Однако очевидно, что из такой клетки трудно получить целый организм, и трансформированная ДНК не может передаваться потомству.

Рисунок 7.29

Джеральд Рубин
(р. 1950)

Рисунок 7.30

Аллан Спрадлинг
(р. 1949)

В конце концов повезло двум американским исследователям Дж. Рубину и А. Спрадлингу (рис. 7.29, 7.30) в 1982 г. В качестве вектора они использовали мобильный *P*-элемент. Для осуществления транспозиции у *P*-элемента присутствуют специальные структуры — концевые повторы — по 150 пн определенной последовательности на каждом конце элемента. Именно с этими участками связывается транспозаза и катализирует процесс встраивания–вырезания *P*-элемента. Таким образом, для перемещения *P*-элемента нужно, чтобы были выполнены два условия: наличие у него неповрежденных концевых повторов и нормальная активность транспозазы. Если будет нарушен какой-либо из экзонов гена транспозазы или во время транскрипции и созревания матричной РНК транспозазы не будет удален один из интронов, полноценный фермент не получится и *P*-элемент не будет перемещаться. Однако недостаток транспозазы из одного *P*-элемента может быть легко компенсирован, если в геноме присутствует еще один *P*-элемент, нормальный, который и обеспечит наличие этого фермента.

С учетом всего перечисленного эксперимент по трансформации у дрозофилы схематически выглядит следующим образом (рис. 7.31): готовят ДНК двух *P*-элементов, один из которых — $\rho\pi$25.7wc — может синтезировать транспозазу, но не способен встраиваться в геном, так как у него поврежден один из концевых (с 3'-конца) повторов, в то время как во втором *P*-элементе — $P[(ry^+)A]$ — удалена значительная часть гена транспозазы, но он может перемещаться по геному, поскольку имеет нормальные концевые повторы.

В *P*-элемент $P[(ry^+)A]$, являющийся вектором и имеющий дефектный ген транспоза-

Рисунок 7.31

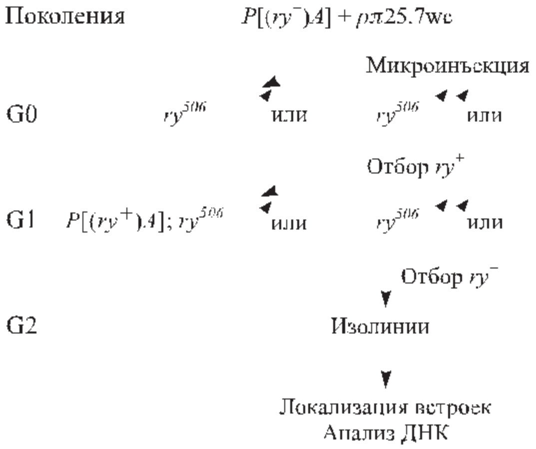


Схема скрещиваний для осуществления трансформации у дрозофилы [Spradling, 1986. P. 177]

зы, обычно встраивают дополнительный фрагмент ДНК длиной до 20 тпн, который хотят трансформировать в геном дрозофилы. *P*-элемент $P[(ry^+)A]$ называют транспозоном, а $\rho\pi$25.7wc — элементом-хелпером или помощником.

Затем смесь этих двух типов ДНК инъецируют в эмбрион дрозофилы. Там некоторая ее часть встраивается в ДНК полярных клеток, из которых позднее образуются клетки зародышевого пути. Таким образом чужеродная ДНК, инъецированная в эмбрион на ранних стадиях развития, передается следующим поколениям потомков.

Многие факторы, в том числе и размер встроенного в *P*-элемент фрагмента чужеродной ДНК, влияют на успех трансформации; в среднем только около 14 % эмбрионов развиваются в плодовитое потомство. Поэтому встает вопрос о том, как различить мух, у которых инъецированная ДНК встроилась в геном, и мух без встройки. Для этого в *P*-элемент $P[(ry^+)A]$ вводят специальные маркерные гены. Это могут быть либо гены дрозофилы, контролирующие окраску глаз, например ген *rosy*, гены дрозофилы, кодирующие синтез ферментов, например алкогольдегидрогеназы, или даже ген, выделенный из генома медузы и кодирующий белок GFP, обнаруживающий при определенных условиях зеленую флуоресценцию.

Разберем сначала схему, в которой используется ген *rosy* (см. рис. 7.31). В этом случае в *P*-элемент $P[(ry^+)A]$ введен фрагмент ДНК, содержащий нормальный аллель гена *rosy* (ry^+). ДНК этого транспозона вместе с ДНК хелпера инъецируют в эмбрионы, гомозиготные по мутации *rosy* — ry^{506}. Если транспозон $P[(ry^+)A]$ встроился в геном, то в поколении G1 будут мухи с нормальным цветом глаз, поскольку у них — гомозигот по мутации ry^{506} — появится ДНК с нормальным аллелем ry^+ в транспозоне.

Недавно в транспозон в качестве маркера стали вводить кДНК гена *GFP*, подшитую к подходящему промотору. В случае инсерции транспозона в различных клетках дрозофилы синтезируется белок GFP. В результате облучения этих клеток длинноволновым ультрафиолетовым светом белок GFP начинает флуоресцировать зеленым светом.

С какими целями используют трансформацию в экспериментальной генетике?

Можно выделить несколько направлений.

1. В процессе клонирования и выделения генов всегда остается вопрос о том, весь ли ген уже в руках экспериментатора, т. е. полностью ли выделены его регуляторная и структурная части. Для выяснения этого в состав транспозона вводят фрагмент ДНК, предположительно содержащий ген, — это фрагмент *A* в транспозоне $P[(ry^+)A]$ (см. рис. 7.31). Затем хромосому со встроенным транспозоном $P[(ry^+)A]$ путем скрещивания вводят мухам, гомозиготным по мутации испытуемого гена. Если в транспозоне присутствуют все части гена *A*, необходимые для его функционирования, то такая особь будет иметь нормальный фенотип, поскольку действие мутантного аллеля *A* полностью перекрывается нормальным аллелем A^+, расположенным в транспозоне. Происходит «спасение» (rescue) мутантного фенотипа — формируется нормальный.

Нетрудно заметить, что, хотя эти работы и выполнены на дрозофиле, по сути здесь речь идет о возможности исправления генетических дефектов посредством вмешательства человека. Если учесть, что трансформация у дрозофилы с 1982 г. применялась тысячи раз, становится очевидным, что по крайней мере на этом модельном объекте проблема исправления генетических дефектов уже в наше время эффективно решается достаточно рутинными методами.

2. Другая цель использования трансформации заключается в исследовании структуры самого гена, т. е. анализа его структурной и регуляторной частей (см. разд. 7.7).

3. Трансформацию на дрозофиле используют для экспериментальной экспрессии генов из других организмов, у которых еще не открыты мобильные элементы, пригодные для создания транспозонов, и не разработаны методы трансформации. Например, можно выделить какой-то ген из генома бабочки-шелкопряда, комара или человека, ввести в геном дрозофилы и проанализировать экспрессию.

Созданы еще более уникальные конструкции, связанные с пересадкой генов. Приведем один пример. Известно, что в геноме комара *Chironomus thummi thummi* присутствуют фракции, повторенные множество раз. Единицей этого повтора является фрагмент длиной 120 пн, обогащенный А–Т-нуклеотидами. Это так называемый *Cla*-повтор. Он рассеян по всей длине хромосом *Ch. th. thummi*, но почти полностью отсутствует у очень близкого вида *Ch. th. piger*, т. е. этот повтор является варьирующей фракцией генома хирономид. Считается, что повторенные последовательности оказывают инактивирующее влияние на гены, расположенные рядом.

Для того чтобы проверить предположение об инактивирующем влиянии *Cla*-повтора, был создан транспозон, содержащий кроме маркерного гена $rosy^+$ еще последовательность нуклеотидов, состоящую из нескольких копий *Cla*-повтора из ДНК хирономуса и расположенно-

го рядом гена *white* (*w*), выделенного из генома дрозофилы. Этот транспозон был введен в эмбрионы дрозофилы, мутантные по гену *w*. Нормальный аллель w^+ обеспечивает формирование у мухи глаз красного цвета, в то время как у гомозигот по мутации *w* глаза белые. Если *Cla*-повтор не оказывает инактивирующего влияния на ген w^+ в транспозоне, глаза у мух $w/w/Tw^+$ будут нормального красного цвета. Если же *Cla*-повтор инактивирует ген w^+ в транспозоне во всех клетках или только в некоторых, то глаза у мух будут соответственно полностью белыми или мозаичными, т. е. в некоторых клетках ген сохраняет активность, в других инактивирован.

4. Поиски энхансеров генов (см. разд. 7.6.3).

5. Создание систем трансформации для направленной экспрессии генов (см. разд. 7.6.3).

6. Индукция сайт-специфической рекомбинации (разд. 8.3.2.2).

Литература к разделу 7.4.10

Жимулёв И. Ф. Трансформация у дрозофилы — новый подход в генетике // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 7. С. 11–16.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 1017–1063.

Brand A. H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. Vol. 118. P. 401–415.

Gehring W. J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye // Genes to Cells. 1993. Vol. 1. P. 11–15.

Halder G., Callaerts P., Gehring W. J. New perspectives on eye evolution // Current Opinion in Genetics & Development. 1995. Vol. 5. P. 602–609.

Lawrence P. A. The making of a fly. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 228 p.

Prasher D. C. Using GFP to see the light // Trends in Genetics. 1995. Vol. 11. P. 320–323.

Spradling A. C. P-element mediated transformation // *Drosophila*: a practical approach / D. B. Roberts, ed. Oxford; Washington: IPL Press, 1986. P. 175–197.

Wilson C., Pearson R. K., Bellen H. J., O'Kane C. J., Grossniklaus U., Gehring W. J. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila* // Genes & Development. 1989. Vol. 3. P. 1301–1313.

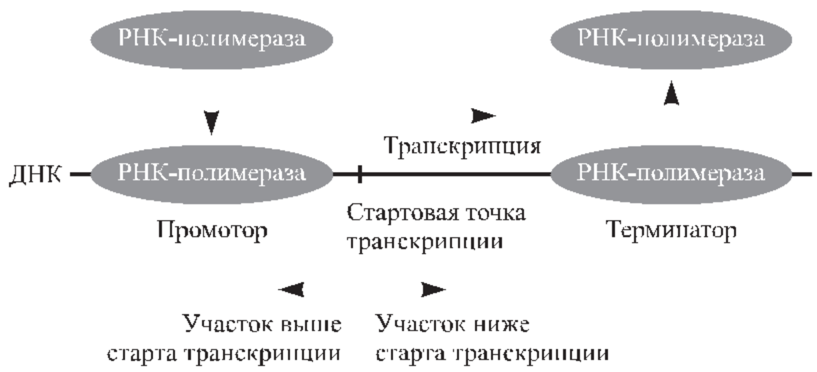
7.5. СТРУКТУРА ТРАНСКРИПТА: СТРУКТУРНАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ ЧАСТИ ГЕНА

Синтез РНК, кодируемой данным геном, называется экспрессией гена. У прокариот единственная РНК-полимераза, состоящая из белкового комплекса — собственно РНК-полимеразы и σ-фактора, синтезирует все виды РНК: мРНК, тРНК и рРНК.

У эукариот три разные РНК-полимеразы транскрибируют РНК с трех разных типов генов. РНК-полимераза I синтезирует 18, 28 и 5,8S РНК, РНК-полимераза II считывает мРНК с генов, кодирующих белки и некоторые snРНК (small nuclear RNA), РНК-полимераза III транскрибирует гены 5S рРНК, тРНК и остальные snРНК.

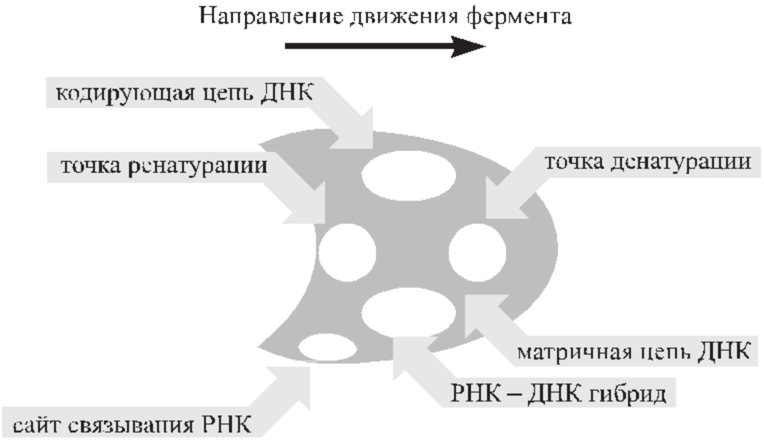
Схема организации типичного гена представлена на рис. 7.32. Каждый ген состоит из регуляторной части, с которой начинается транскрипция кодирующей части, где записана информация о структуре белка, и терминирующей части, где завершается транскрипция.

Рисунок 7.32



Единица транскрипции, содержащая различные элементы гена [Lewin, 2000. P. 234]

Рисунок 7.33



Транскрипционный «пузырек» [Lewin, 2000. P. 235].
В ходе транскрипции РНК-полимераза денатурирует двухцепочечную спираль ДНК и вновь восстанавливает ее, поддерживает кодирующую и матричную цепи ДНК в выпрямленном состоянии и синтезирует РНК

Двойная спираль ДНК в области промотора денатурируется под действием РНК-полимеразы у прокариот или транскрипционного комплекса у эукариот (рис. 7.33) с образованием транскрипционного «пузырька». РНК синтезируется в направлении от 5'- к 3'-концу по одной из цепей ДНК, которая называется матричной. Вторая цепь называется кодирующей.

Транскрипция заканчивается, когда молекула РНК-полимеразы достигнет терминирующего участка, или терминатора (см. рис. 7.32). У прокариот обнаружено два типа терминирующих последовательностей: один опознается непосредственно РНК-полимеразой, другой — РНК-полимеразой в ассоциации с ρ-фактором. Каждый ген имеет последовательность одного типа.

Исследование процессов, происходящих при синтезе мРНК, показало, что продукты транскрипции, синтезируемые в ядрах эукариот на ДНК хромосом, гораздо крупнее, чем образуемые из них и выходящие в цитоплазму матричные РНК, поступающие в рибосомы и участвующие в трансляции. Такие транскрибированные с ДНК и находящиеся в клеточном ядре предшественники мРНК, очень разнообразные по своему нуклеотидному составу, называются гетерогенными ядерными РНК или про-мРНК.

Выяснилось, что в гетерогенных ядерных РНК присутствуют протяженные участки, считанные с участков генов, не кодирующих информацию о структуре белка, — интронов. В результате сложного процесса созревания РНК, называемого процессингом, образуется зрелая молекула матричной РНК уже существенно меньшего размера. В ходе процессинга (или посттранскрипционных модификаций РНК) удаляются участки, соответствующие интронам, происходит сращивание экзонов (сплайсинг), добавляется короткий фрагмент на 5'-конце (5'-кэп) и поли$(A)^+$-хвост на 3'-конце молекулы РНК.

На рис. 7.34 представлена схема строения зрелой биологически активной мРНК из клеток эукариот. Аналогичная мРНК обнаруживается и в клетках прокариот, но в ней нет поли$(A)^+$-последовательности.

Литература к разделу 7.5

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. 446 с.

Георгиев Г. П. Гипотеза о структурной организации оперона и регуляции синтеза РНК в животной клетке // Мол. биол. 1970. № 4. С. 17–29.

Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989. 254 с.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 349–356.

Гвоздев В. А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // Соросовский образовательный журн. 1996. № 12. С. 11–18.

Овчинников Л. П. Что и как закодировано в мРНК // Соросовский образовательный журн. 1998. № 4. С. 10–18.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 377–401.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 233–235.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 379–417.

Рисунок 7.34

Схема расположения функциональных участков на молекуле мРНК у эукариот [Овчинников, 1998. С. 17]

7.6. РЕГУЛЯТОРНАЯ ЧАСТЬ ГЕНА

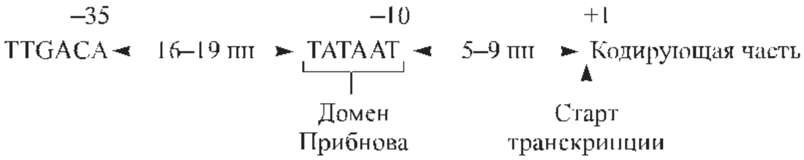
7.6.1. Промоторы и регуляторы

У прокариот процесс транскрипции осуществляется с помощью голоэнзима (или «полного энзима») РНК-полимеразы, состоящего из собственно РНК-полимеразы и присоединяющегося к ней σ-фактора. Собственно РНК-полимераза состоит из 4 полипептидов: двух α, а также β и β'-субъединиц. РНК-полимераза осуществляет основную реакцию полимеризации рибонуклеотидов, ее функция заключается в копировании РНК с одной из нитей двойной цепи ДНК, σ-фактор необходим для опознавания промотора — особого участка в начале гена.

Промоторы имеют определенные последовательности нуклеотидов, «узнаваемые» РНК-полимеразой. Более 100 промоторов были секвенированы у *E. coli*, и наиболее удивительным оказалось почти полное отсутствие у них гомологии 60-нуклеотидного района, связывающего РНК-полимеразу.

Однако четыре постоянные особенности в бактериальных промоторах все-таки были найдены (рис. 7.35): 1) наличие стартовой точки транскрипции; 2) особая последовательность нуклеотидов начиная с положения –10; 3) особая последовательность нуклеотидов в районе –35; 4) разобщение последовательно-

Рисунок 7.35



Наиболее типичный промотор прокариот, имеющий три компонента: домены последовательностей в областях –10, –35 и стартовую точку транскрипции [Lewin, 2000. P. 245–246].

Частота встречаемости нуклеотида в области –10 (%):

T_{80} A_{95} T_{45} A_{60} A_{50} T_{96}, в области –35: T_{82} T_{84} G_{78} A_{65} C_{54} A_{45}

стей в районах –10 и –35. Рассмотрим их подробнее.

1. В стартовой точке транскрипции (> 90 % промоторов) располагается пурин. Довольно часто это центральный нуклеотид в последовательности CAT, однако степень консерватизма этого триплета невелика, чтобы его можно было считать обязательным сигналом.

2. Шесть нуклеотидов в районе от –10 обнаруживают почти во всех промоторах. Они были найдены впервые в 1975 г. Д. Прибновым (D. Pribnow) в промоторах двух генов бактериофага T7.

3. Шесть фиксированных нуклеотидов обнаружено в районе –35.

4. Расстояние, разделяющее указанные консервативные последовательности, составляет 16 и 18 пн в 90 % промоторов. В виде исключений может быть 15, 19 или 20. Это расстояние важно, поскольку согласуется с формой молекулы РНК-полимеразы.

Вначале РНК-полимераза контактирует с районом от –55 до +20 пн (рис. 7.36). Инициирующий комплекс содержит РНК-полимеразу и σ-фактор, который слабо связывается с участком промотора в положении –35 пн, контролируя посадку РНК-полимеразы именно на промотор.

Затем РНК-полимераза связывается с доменом Прибнова — районом вблизи положения –10. Одновременно с этим расплетается полностью почти два витка двойной спирали ДНК (длиной в 17 пн) вокруг нуклеотида в положении –10. Следует отметить, что в этом положении присутствуют в основном А–Т нуклеотиды, имеющие по две водородные связи между собой, что значительно облегчает возможность их разъединения.

Поскольку промоторы слегка различаются по последовательностям нуклеотидов, эффективность связывания РНК-полимеразы, а следовательно, и скорость транскрипции сильно варьируют от гена к гену.

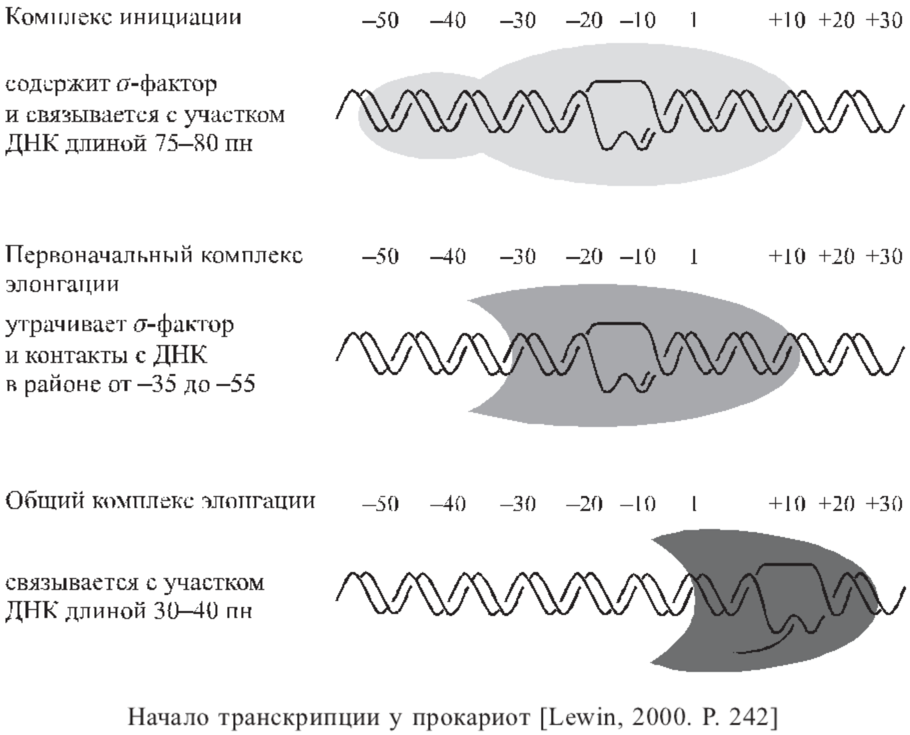
Когда σ-фактор диссоциирует, собственно РНК-полимераза укорачивается в положении выше –30, а после перемещения фермента на несколько пар нуклеотидов он становится еще более компактным, превращаясь в комплекс элонгации (см. рис. 7.36).

У эукариот процесс транскрипции значительно усложнен в связи с тремя обстоятельствами.

Во-первых, транскрипция осуществляется под действием трех разных РНК-полимераз.

Во-вторых, РНК-полимераза эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активирования необходимо большое число белков, называемых общими факторами транскрипции, которые должны объединиться в комплекс, прежде чем транс-

Рисунок 7.36



Начало транскрипции у прокариот [Lewin, 2000. P. 242]

Рисунок 7.37

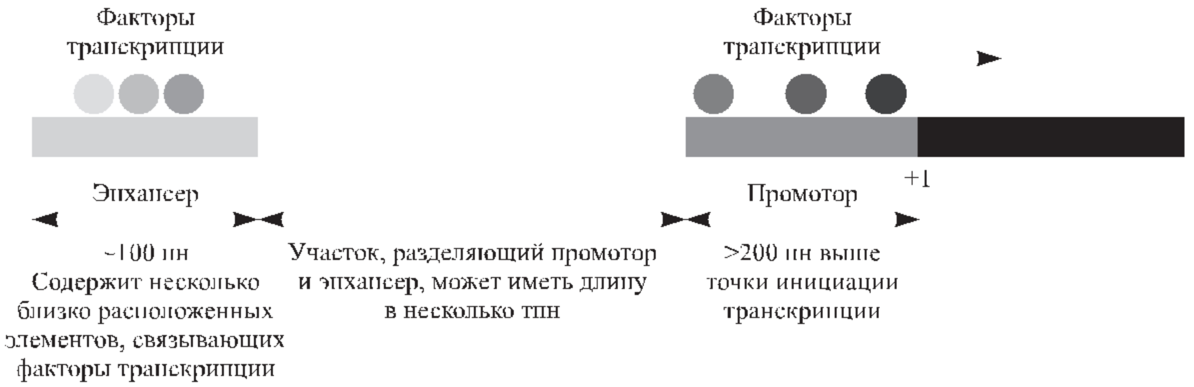
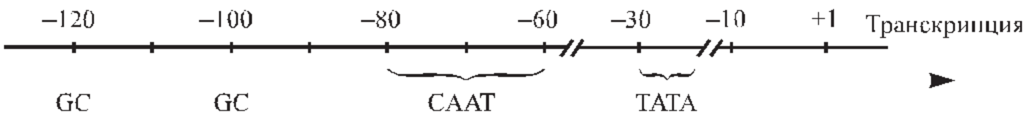


Схема организации регуляторного участка гена, транскрибируемого РНК-полимеразой II [Lewin, 2000. P. 618]

Рисунок 7.38



Структура промотора у эукариот [Russell, 1998. P. 390].
+1 — точка начала транскрипции. Последовательность TATA, вероятно, контролирует выбор стартовой точки транскрипции; последовательность CAAT, по-видимому, контролирует первоначальное связывание РНК-полимеразы с промотором. С помощью GC-домена, очевидно, происходит связывание РНК-полимеразы с окрестностями стартовой точки транскрипции

крипция начнется. Формирование комплекса — это многоступенчатый процесс, от прохождения которого будет в конечном счете зависеть скорость инициации транскрипции. Во многих случаях регуляторные белки действуют, влияя главным образом на процесс сборки транскрипционного комплекса.

И наконец, в-третьих, большинство регуляторных белков у эукариот может влиять на скорость транскрипции, даже если эти белки связываются с участками ДНК, расположенными за тысячи пар нуклеотидов от промотора.

Рассмотрим организацию контролирующей зоны гена, транскрибируемого с помощью РНК-полимеразы II (рис. 7.37). Типичный ген, считываемый этим ферментом, имеет промотор, расположенный выше точки инициации транскрипции. Он содержит несколько коротких (меньше 10 пн) последовательностей нуклеотидов, с которыми связываются факторы транскрипции. Эти последовательности разбросаны на участке длиной свыше 200 пн [Lewin, 2000]. Они могут быть позитивными (PRE — positive regulatory elements) и негативными (NRE).

Энхансер содержит более плотно расположенные элементы из нуклеотидов, которые также связывают факторы транскрипции. Фактором транскрипции называют любой белок, который необходим для инициации транскрипции, но не является собственно РНК-полимеразой. Промоторные и энхансерные участки генов выявляют в результате анализа мутантов и особого метода электрофореза, называемого футпринтированием. Регуляторные последовательности ДНК необходимы как для инициации транскрипции, так и для регулирования ее скорости и интенсивности. Поэтому промоторный район состоит из участка, на котором образуется комплекс из РНК-полимеразы II и общих факторов транскрипции, а также многочисленных регуляторных элементов-последовательностей, с которыми связываются различные регуляторные белки или специфические факторы транскрипции (рис. 7.38). Регуляторные

Дополнение 7.5

В 1959 г. за открытие механизма биологического синтеза рибонуклеиновой кислоты С. Очоа (Severo Ochoa) была присуждена Нобелевская премия.

элементы гена могут быть расположены как выше, так и ниже точки начала транскрипции. Одним из наиболее известных регуляторных элементов гена является промотор, который состоит из нескольких элементов. Из них самым близким к точке начала транскрипции является ТАТА-домен (5'-TATAAA-3'), называемый также доменом Хогнесса или доменом Голдберга–Хогнесса. Затем следуют домены CAAT (5'-GGCCAATCT-3') и GC (5'-GGCCGG-3'). Промоторы могут содержать различные комбинации элементов, но ни один элемент не встречается во всех промоторах. Например, у *D. melanogaster* были проанализированы данные о первичной структуре 252 независимых промоторов. Как оказалось, ТАТА-домен находится в положении от –25 до –30. Неожиданно было обнаружено, что половина промоторов у дрозофилы не имеют этого домена [Arkhipova, 1995]. Некоторые промоторы имеют более одной копии CAAT или GC. Домен CAAT играет существенную роль в инициации транскрипции, TATA и GC, по-видимому, выполняют вспомогательные роли.

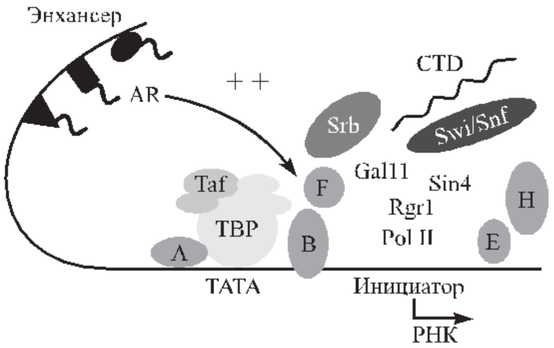
Что касается стартовой точки транскрипции (INR), то, несмотря на отсутствие гомологии по последовательности нуклеотидов между разными генами, все же есть тенденция к тому, что первым нуклеотидом в мРНК является А, фланкированный с каждой стороны пиримидинами. Этот район называется инициаторным и в общем виде может быть представлен формулой Py_2 $CAPy_5$.

Общие факторы транскрипции необходимы для инициации транскрипции на всех типах промоторов. Они связываются с РНК-полимеразой II, формируя комплекс, окружающий стартовую точку. Они же определяют сайт инициации. Общие факторы транскрипции вместе с РНК-полимеразой составляют базовый транскрипционный аппарат.

Общие факторы транскрипции к настоящему времени очищены и выделены. Их шесть: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF и TFIIH (по некоторым данным, семь — описан TFIIJ). Они обозначаются первыми буквами слов transcription factors — TF с добавлением римской цифры I, II или III в зависимости от того, какая это РНК-полимераза — I, II или III. Далее следует обозначение собственно белковой молекулы. Вместе с РНК-полимеразой II они могут инициировать транскрипцию во внеклеточных системах *in vitro*.

Некоторые общие факторы транскрипции в свою очередь состоят из многих полипептидов. Сложную организацию имеет комплекс TFIIH. У млекопитающих РНК-полимераза II включает 12–14 полипептидов, в результате

Рисунок 7.39

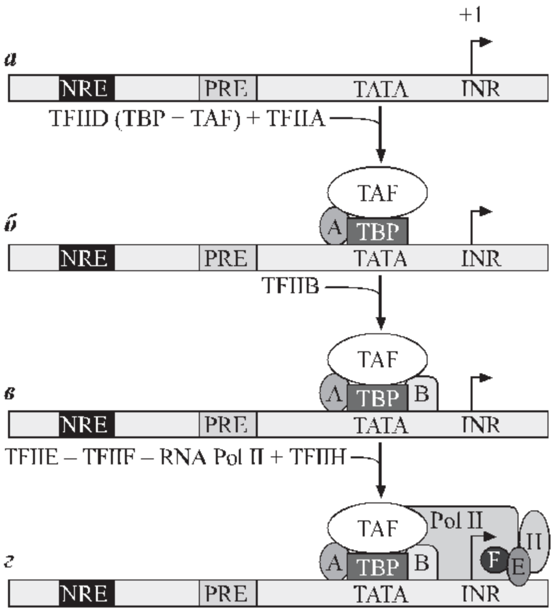


Расположение белков в типичном промоторе эукариот [Struhl, 1996]

чего молекулярная масса этого комплекса доходит до 600 кДа. В состав транскрибирующего комплекса входят недавно открытые белки, называемые Srb (suppressors of RNA PolII), которые связываются с большой субъединицей РНК-полимеразы (рис. 7.39). Эти белки помогают РНК-полимеразе разрушить нуклеосомы и декомпактизовать молекулу ДНК. Кроме того, молекула фактора транскрипции TFIIH связана с белками, участвующими в репарации ДНК (так называемой эксцизии нуклеотидов). РНК-полимераза II связана еще с группой белков семейства Swi/Snf, которые могут разрушать нуклеосомы.

Формирование белкового комплекса на промоторной последовательности начинается с того, что фактор транскрипции TFIID связывается с ТАТА-доменом (рис. 7.40). TFIID состоит в свою очередь из многих субъединиц. Те из них, которые ответственны за распознавание ТАТА-последовательности, называются TBP (TATA-binding proteins). Это небольшие молекулы ~30 кДа. Другие субъединицы называются TAF (TBP-associated factors). Их размеры варьируют от 30 до 250 кДа. Общая масса TFIID, содержащего TBP и 11 молекул TAF, составляет примерно 800 кДа. Комплекс TBP + TAF служит в качестве сайта связывания фактора TFIIB, который привлекает РНК-полимеразу II и TFIIF, в результате чего формируется «минимальный комплекс инициации транскрипции». TFIIF состоит из двух субъединиц. Большая (RAP74) имеет АТР-зависимую геликазную активность и может быть вовлечена в процесс плавления ДНК во время инициации. Меньшая субъединица (RAP38) плотно связывается с РНК-полимеразой II. Для начала транскрипции РНК-полимераза II должна освободиться от комплекса факторов транскрипции. Ключевым в процессе инициации транскрипции является присоединение факторов транскрипции

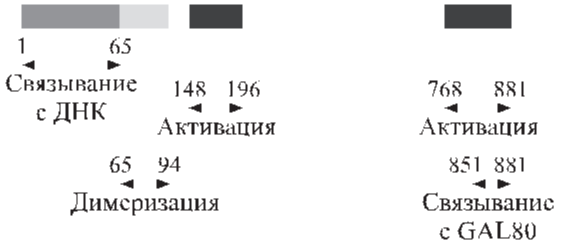
Рисунок 7.40



Сборка общего транскрипционного комплекса [Hanna-Rose, Hansen, 1996]:

а — типичный промотор гена эукариот, содержащий элемент инициации транскрипции (INR) и TATA-домен, а также некоторое число позитивных (PRE) и негативных регуляторных элементов (NRE); *б–г* — порядок сборки общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II на промоторе

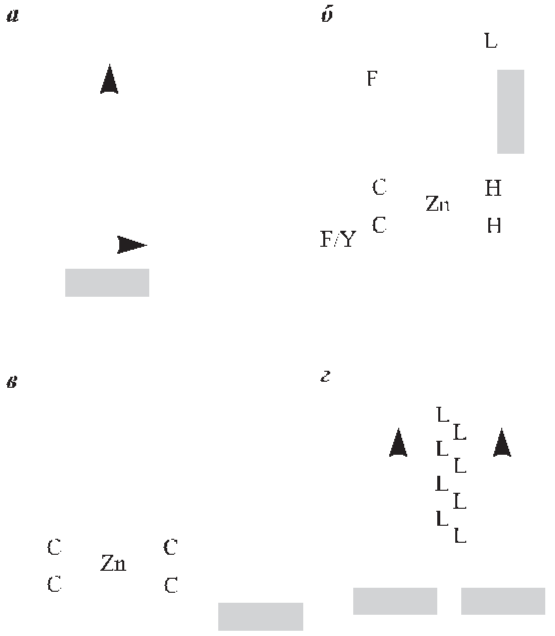
Рисунок 7.41



Структура белка-активатора GAL4 у дрожжей [Lewin, 2000. P. 64].

Указана локализация (цифры обозначают номер аминокислотного остатка в белке) независимых районов, которые связываются с ДНК, активируют транскрипцию (2 района), участвуют в димеризации белка и связываются с регулятором GAL80

Рисунок 7.42



Схематическое изображение выявляемых в белках структурных доменов связывания с ДНК [Struhl, 1989]:

а — спираль–поворот–спираль, *б*, *в* — «цинковые пальцы», *г* — «лейциновая застежка».

Прямоугольниками изображены фрагменты ДНК, с которыми взаимодействуют белковые домены

TFIIH и TFIIE. Еще один фактор — TFIIJ присоединяется после TFIIE. Одна из субъединиц TFIIH, обладающая протеинкиназной активностью, фосфорилирует молекулу РНК-полимеразы II. Фосфорилирование происходит в зоне длинного полипептидного «хвоста» CTD, в результате чего молекула полимеразы изменяет конформацию, становится готовой к транскрипции и освобождается от всех факторов транскрипции, кроме TFIID. На примере нескольких генов установлено, что это фосфорилирование освобождает РНК-полимеразу II и позволяет начать транскрипцию.

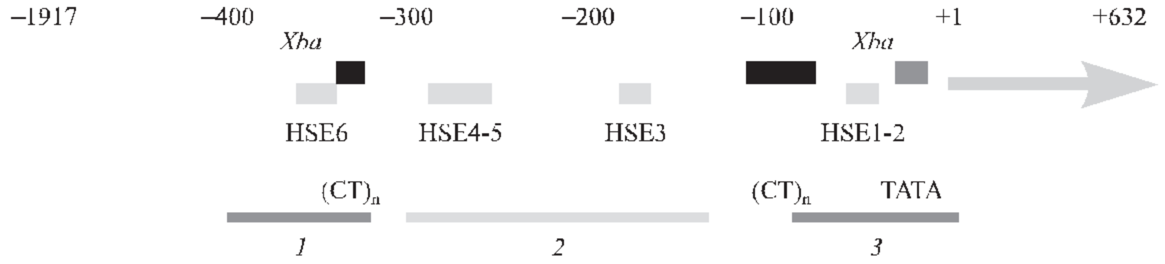
Всего в состав комплексов общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II входит до 50 белков, иногда эти комплексы называют транскриптосомами.

Две другие РНК-полимеразы, I и III, найденные у эукариот, также требуют для активирования набор общих факторов транскрипции. С ними не все ясно. Установлено лишь, что белки TBP нужны для всех трех полимераз. Другие факторы отличаются от тех, что были описаны в комплексах с РНК-полимеразой II.

Комплекс РНК-полимеразы II и общих факторов транскрипции может функционировать, но с низкой эффективностью. Чтобы достичь необходимого уровня функционирования, требуется участие специфических факторов транскрипции. Это регуляторные белки, необходимые для контроля процесса образования белкового комплекса на промоторе.

Специфические факторы транскрипции должны обладать двумя важнейшими свойствами:

Рисунок 7.43



Участок контролирующего элемента гена *hsp26* у *Drosophila melanogaster* [Lu et al., 1993]:
1, *3* — дистальный и проксимальный участки гиперчувствительности к ДНК-азе I;
2 — участок формирования нуклеосомы.
$(CT)_n$ — GAGA-сайт

1) опознавать специфические последовательности-мишени, расположенные в энхансерах, промоторах и других регуляторных элементах данного гена; 2) связываться с другими компонентами транскрипционного аппарата после присоединения к ДНК.

Очень часто молекула фактора транскрипции имеет разобщенные домены связывания с ДНК и активаторами транскрипции. Иногда возникает третий домен, связующий два предыдущих (соединяющий домен).

Особенно детально описана структура активатора транскрипции GAL4 у дрожжей. Регуляция этим белком происходит на последовательности UAS (upstream activating sequence). Белок GAL4 выполняет три функции: он связывается с участком ДНК в UAS, активирует транскрипцию, связывается с другим регуляторным белком GAL80. Каждая из этих функций локализована в особом районе белка (рис. 7.41).

В некоторых случаях целый ряд генов может отвечать на какой-то общий индуцирующий агент. В этих случаях регуляторные участки данных генов связываются с белками, имеющими общие последовательности аминокислот (мотивы), позволяющие им связываться с ДНК.

Известны различные белки, имеющие следующие специфические мотивы связывания с ДНК:

1. Домен связывания с ДНК рецепторов стероидных гормонов. Каждый рецептор активируется в результате связывания определенного стероида.

2. Мотив «цинковые пальцы» (zinc-finger) (рис. 7.42). Первоначально этот мотив был открыт у белка TFIIIA, затем у многих других факторов транскрипции.

3. Спираль–поворот–спираль. Одна L-спираль лежит в широкой бороздке ДНК, вторая под углом поперек ДНК. Этот домен был описан у фаговых репрессоров, в белках, регулирующих развитие (гомеодомен).

4. Спираль–петля–спираль. Обнаружен в некоторых белках, регулирующих развитие.

5. «Лейциновая застежка» состоит из последовательности аминокислот с остатком лейцина в каждой седьмой позиции. Мотивы двух белков взаимодействуют, образуя димер.

Ниже приведены некоторые примеры организации регуляторных участков, обнаруженных у генов эукариот.

Гены, отвечающие на тепловой шок (см. разд. 13.10), имеют в составе регуляторной зоны от трех до шести «элементов теплового шока» — HSE (рис. 7.43), которые представлены 14-членными последовательностями нуклеотидов (рис. 7.44).

Известно, что гены теплового шока очень быстро реагируют на индуцирующее воздействие. В соответствии с таким типом индукции у них устроены регуляторные районы.

В неиндуцированной тепловым шоком клетке (рис. 7.45) находятся белковые факторы HSF, они неактивны и не связываются с промоторными HSE-элементами. РНК-полимераза II занимает участок гена в районе точки инициации транскрипции. В результате теплового шока белок HSF модифицируется и связывается с промотором гена *hsp*. Это приводит к активации РНК-полимеразы II либо путем воздействия

Рисунок 7.44

C--GAA--TTC--G
►◄

Последовательность нуклеотидов, составляющая контролирующий элемент HSE у дрозофилы [Lis et al., 1990. — Из: Жимулёв, 1994. С. 339]

Рисунок 7.45

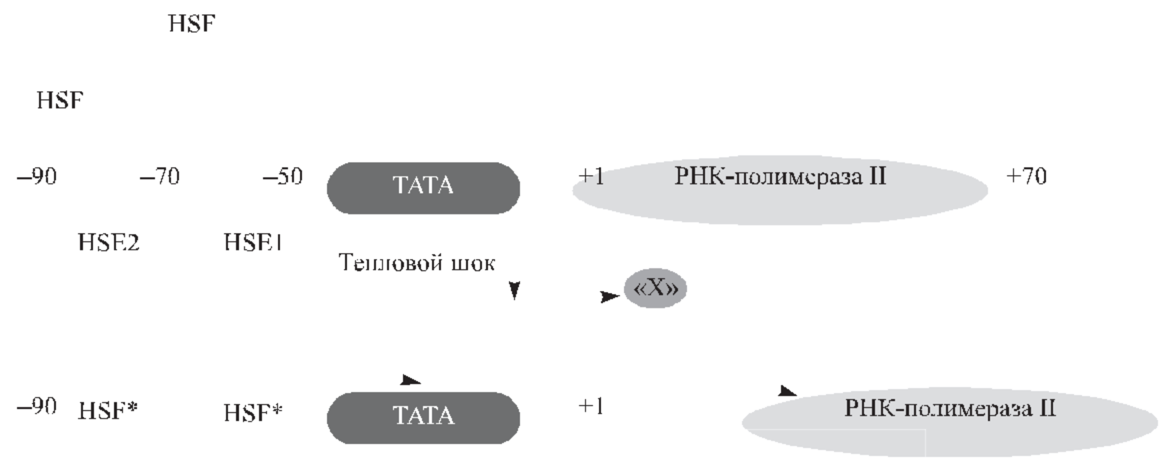


Схема изменений в компонентах промоторной зоны гена *hsp70* дрозофилы во время индукции тепловым шоком [Rougvie, Lis, 1988. — Из: Жимулёв, 1994. С. 354]

Рисунок 7.46

Регуляторные последовательности в 5'-нетранскрибируемом районе гена *hsp23* у дрозофилы [Mestril et al., 1986. — Из: Жимулёв, 1994. С. 343].

ECR — участки связывания с экдизон-рецепторным комплексом, HSE — элементы связывания фактора теплового шока

на TATA-домен, либо через высвобождение гипотетического белка «X», блокирующего РНК-полимеразу II (см. рис. 7.45).

Некоторые из генов *hsp* индуцируются также гормонами. Соответственно промоторы этих генов организованы сложнее (рис. 7.46). В них перемежаются регуляторные элементы обоих типов. Повтор $(CT)_n$ связывает белок, называемый GAGA-фактором. Последний устанавливает и поддерживает состояние гиперчувствительности к ДНК-азе I до индукции тепловым шоком, в то время как HSF связывается с элементами HSE в уже активированном хроматине и инициирует транскрипцию.

В некоторых случаях активаторы и репрессоры генной активности имеют идентичную локализацию и действуют антагонистически. Например, белки группы Polycomb связываются с участком, называемым PRE (*Polycomb* response element), и поддерживают неактивное состояние гена. Активирующий фактор (GAGA-фактор), кодируемый продуктом гена *trithorax-like*, связывается с GA-богатыми последовательностями и имеет сайты связывания также в пределах PRE.

Литература к разделу 7.6.1

Гвоздев В. А. Механизмы регуляции активности генов в процессе транскрипции // Соросовский образовательный журн. 1996. № 1. С. 23–31.

Жимулёв И. Ф. Современные представления о структуре гена у эукариот // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 7. С. 17–24.

Патрушев Л. И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000. С. 36–183.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 421–432.

Arkhipova I. R. Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis // Genetics. 1995. Vol. 139. P. 1359–1369.

Hanna-Rose W., Hansen U. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors // Trends is Genetics. 1996. Vol. 12. P. 229–234.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 233–271, 627.

Lu Q., Wallrath L. L., Granok H., Elgin S. C. R. $(CT)_n(GA)_n$ repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila hsp26* gene // Mol. Cell. Biol. 1993. Vol. 13. P. 2802–2814.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 379–417.

Struhl K. Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription // Cell. 1996. Vol. 84. P. 179–182.

7.6.2. Метод репортерных генов для изучения регуляторных участков генов

Одним из подходов к изучению организации регуляторной части гена является метод репортерных генов, разработанный в лаборатории В. Геринга в 1985 г. Впервые он был применен на гене *fushi tarazu (ftz)*. Авторы имели фрагмент ДНК, в котором располагалась кодирующая часть гена *ftz*, а выше 5'-конца кодирующей части — еще один отрезок ДНК длиной 6,1 тпн, содержащий регуляторную часть гена. Если трансформировать мутантов *ftz* транспозоном, включающим весь фрагмент ДНК, у потомков формируется нормальный фенотип. Это значит, что и регуляторная, и структурная части гена функционируют нормально. Затем авторы удалили кодирующую часть *ftz,* присоединили на ее место кодирующую часть гена *lacZ*, выделенного из бактерии *E. coli,* и трансформировали этим транспозоном эмбрионы дрозофилы. Следует отметить, что ген *lacZ* кодирует фермент β-галактозидазу, расщепляющую β-галактозиды. В условиях эксперимента можно подобрать особый галактозид, например вещество, называемое X-gal, в результате расщепления которого образуются соли, имеющие синюю окраску и нерастворимые в воде. Теперь, если искусственно созданный ген, состоящий из регуляторной части *ftz* и гена *lacZ,* проработает, а затем органы мухи будут проинкубированы с X-gal, то клетки, в которых такой ген был активен, окрасятся в синий цвет — цвет водонерастворимого продукта расщепления X-gal (рис. 7.47). В данном случае ген *lacZ* ведет себя как репортер, сообщающий о работе регуляторной части гена *ftz*. Оказалось, что у трансформантов, содержащих в геноме транспозон, гибридный ген *ftz/lacZ* функционирует в тех же клетках, что и нормальный ген *ftz*.

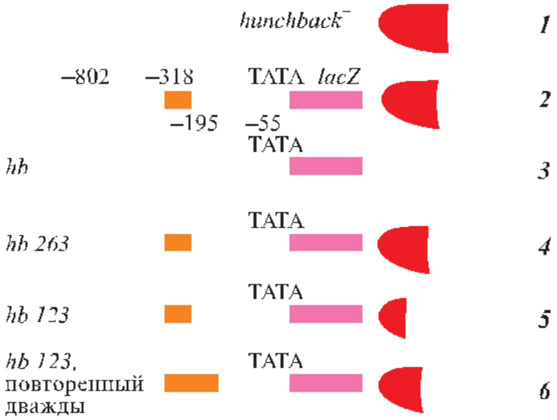
Теперь можно попытаться узнать, какие именно участки регуляторной части гена более необходимы для нормального функционирования. С помощью особых приемов можно удалять разные части регуляторного фрагмента, объединять их с *lacZ*, трансформировать эмбрионы и следить за экспрессией *lacZ.*

Рассмотрим результаты такого эксперимента с геном *hunchback*. В нормальном развитии белковый продукт гена *hunchback* распределяется в передней части эмбриона (рис. 7.48, *1*). Используя трансформацию, установили, что регуляторная последовательность гена *hunchback* длиной 747 пн выше репортера *lacZ* (*2*) вполне достаточна для почти нормального распределения продукта *lacZ*. В последующих экспериментах удалось показать, что фрагмент длиной 263 пн (между –55 и –318) абсолютно небходим для экспрессии *lacZ* (*3*). Если доба-

Рисунок 7.47

Локализация клеток (окрашены синим) имагинальных дисков дрозофилы, в которых экспрессируется ген *lacZ*

Рисунок 7.48



Локализация регуляторной зоны гена *hunchback* с помощью гена-репортера *lacZ* [Lawrence, 1992. P. 53]:

1 — распределение продукта гена *hunchback*⁺ (показано красным) в передней части эмбриона; *2–6* —распределение продукта гена *lacZ* при удалении той или иной части регуляторной зоны. Цифры (–805 и др.) обозначают порядковый номер нуклеотида, считая нулевым первый нуклеотид гена *lacZ*

вить только этот фрагмент, его достаточно для почти нормальной экспрессии *lacZ* (*4*). Другие варианты изменения состава регуляторной зоны дают разные промежуточные уровни активности гена-репортера (*5*, *6*).

Литература к разделу 7.6.2

Lawrence P. A. The making of a fly. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 228 p.

7.6.3. Энхансерные участки гена

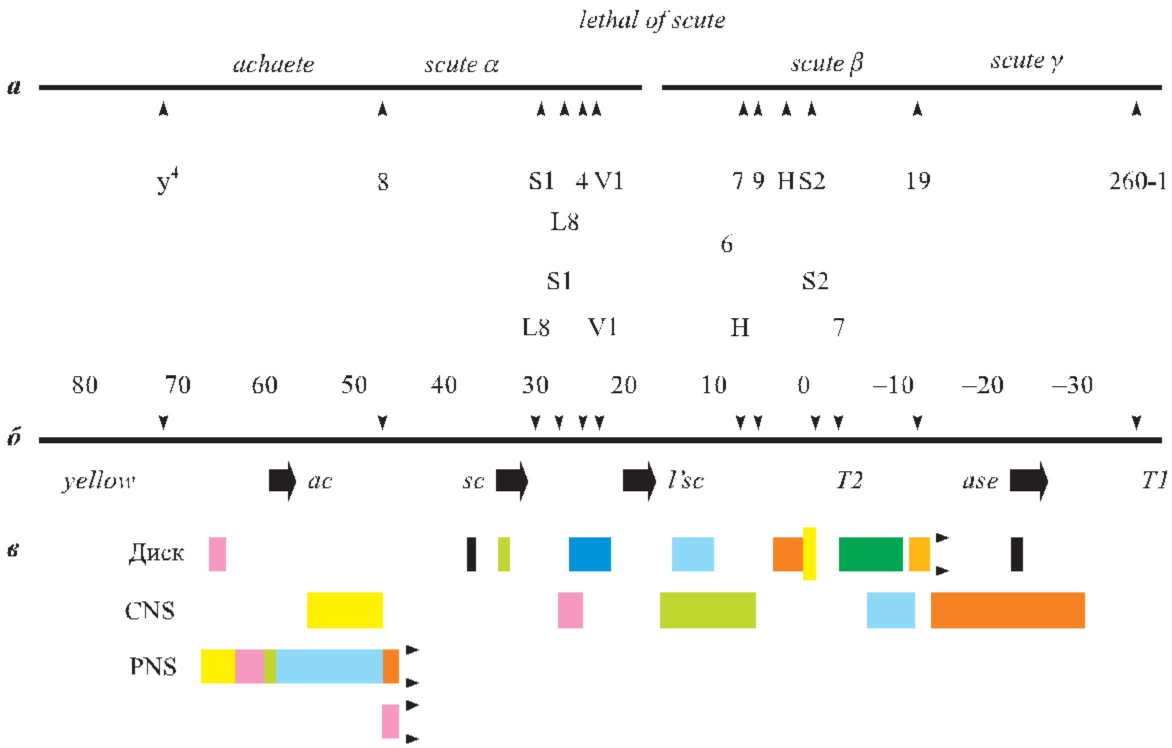
Хотя промоторные элементы являются решающими в осуществлении транскрипции, в целом, для того чтобы она проходила максимально эффективно, необходимы энхансерные элементы.

В 1981 г. Дж. Банерджи (J. Banerji), С. Расскони (S. Rusconi) и С. Шеффнер (S. Schaffner) обнаружили, что транскрипция гена β-глобина усиливается в сотни раз, когда этот ген связан с некоторыми последовательностями нуклеотидов вируса SV40, названными этими авторами энхансерами (усилителями). Энхансеры отличаются от промоторов в трех отношениях: во-первых, расстояние, на которое они удалены от точки инициации транскрипции, не является фиксированным, во-вторых, это расстояние очень большое, а в-третьих, многие энхансеры могут располагаться не только в 5'-, но и в 3'-области, и в середине гена.

Энхансер вируса SV40 локализован в участке генома, содержащем две идентичные последовательности длиной по 72 пн каждая. Эти последовательности лежат в районе с необычной структурой хроматина, определяющей гиперчувствительность к нуклеазе. Каждый повтор из 72 пн содержит копию энхансера. В пределах этих энхансеров расположена серия регуляторных элементов, повреждение которых мутациями приводит к значительному уменьшению действия на активность транскрипции. Многие из этих регуляторных элементов встречаются и в промоторных участках.

Известно, что энхансерные последовательности служат в качестве специфических участков связывания особых регуляторных белков, активирующих процесс транскрипции. Этот

Рисунок 7.49

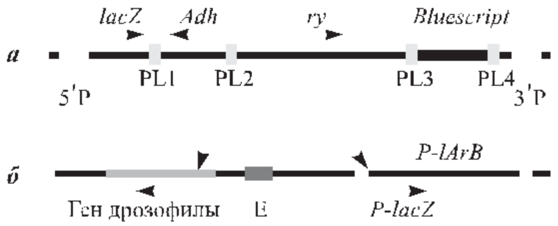


Локализация на молекулярной карте энхансеров генного комплекса *Achaete–Scute Complex* у дрозофилы [Modolell, Campuzano, 1998]:

а — фенотипическая, *б* — молекулярная карта комплекса (под горизонтальной линией в виде стрелок изображены гены); *в* — локализация энхансеров в клетках крылового и имагинального дисков и эмбриональных центральной (CNS) и периферической (PNS) нервных систем.

Вертикальные стрелки соединяют гомологичные участки на фенотипической и физической картах комплекса

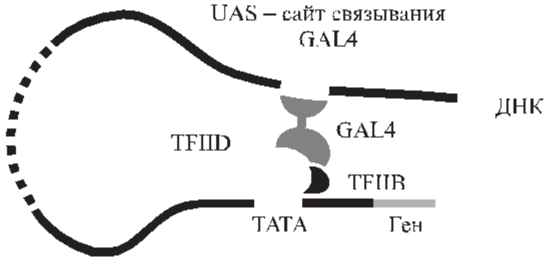
Рисунок 7.50



Структура транспозона *P-lArB* и схема действия энхансера на промотор *P*-элемента [Wilson et al., 1989]:

а — схема транспозона *P-lArB* (*lacZ*, *Adh*, *ry* — гены β-галактозидазы *E. coli*, алкогольдегидрогеназы и ксантиндегидрогеназы дрозофилы соответственно; стрелки указывают направление транскрипции; 5'P и 3'P — концевые части *P*-элемента; PL1–4 — полилинкеры, содержащие множественные сайты рестрикции; *Bluescript* — плазмида, позволяющая клонировать геномную ДНК в участке встраивания транспозона); *б* — воздействие энхансера (E) на природный ген в геноме дрозофилы и на встроенный чужеродный элемент *P-lArB*

Рисунок 7.51



Взаимодействие белка GAL4 с участком UAS и транскрипционным комплексом, в результате чего облегчается присоединение к комплексу фактора транскрипции TFIIB. Это увеличивает скорость транскрипции примерно в 1000 раз [Alberts et al., 1994. P. 425]

тип контроля генной активности на расстоянии является скорее правилом, чем исключением. Как эти белки могут действовать на больших расстояниях?

Согласно самой простой модели, ДНК между энхансером и промотором образует петлю, в результате чего белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с одним из общих факторов транскрипции или с молекулой самой РНК-полимеразы (см. рис. 7.39).

Число общих факторов транскрипции невелико, хотя они очень обильно представлены в клетке, поскольку связываются с промоторами всех генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Кроме этого в клетке существуют тысячи различных других регуляторных белков, связывающихся с регуляторными сайтами контролирующей зоны. Их наборы различаются в разных клетках и у разных генов. Каждый из этих белков представлен малым числом молекул, и большинство их распознает свою особую последовательность нуклеотидов в регуляторных сайтах генов. С помощью белков-регуляторов каждый ген специфически включается или выключается, т. е. фактически каждому органо- или тканеспецифическому гену соответствует свой энхансер (рис. 7.49).

Существуют также зоны ДНК, ответственные за репрессию активности генов — сайленсеры.

Очень часто для понимания процессов развития необходимо выявить максимальное число генов, функционирующих в той или иной ткани. В лаборатории В. Геринга в 1987–1989 гг. был разработан метод трансформации, позволяющий обнаруживать гены, вовлеченные в развитие. Геринг и его коллеги создали транспозон, в котором ген *lacZ* помещен под контроль слабого промотора, имеющегося в *P*-элементе. Если такой транспозон встраивается в окрестности энхансерного элемента какого-то гена, функционирующего у дрозофилы в ходе нормального развития, этот энхансер может активировать слабый промотор *P*-элемента и соединенного с ним гена *lacZ* (рис 7.50). В результате активирования гена *lacZ* после окрашивания внутренних органов дрозофилы реактивом X-gal можно обнаружить клетки синего цвета и таким образом установить, что в зоне встраивания транспозона в молекуле ДНК находится ген, активно функционирующий в данной клетке. Используя перемещения транспозона и собирая те линии, в которых *lacZ* активен, можно выявить все или существенную часть генов, активно функционирующих в той или иной дифференцированной ткани. Наличие в составе транспозона плазмиды *pBluescript* (см. рис. 7.50, *а*) дает возможность клонировать и ген, находящийся под контролем энхансера, и сам энхансер. Этот метод имеет название поиска энхансеров (enhancer trapping).

У дрожжей известны элементы, по своему действию похожие на энхансеры, которые называются UAS (upstream activating sequences). Подобно энхансерам, они могут функционировать в любой ориентации и на различных расстояниях от промотора. Однако, в отличие от энхансера, UAS не могут работать, когда локализованы ниже промотора. UAS-последовательности активируются, когда с ними связываются белки GAL4 (рис. 7.51).

В последние несколько лет появился новый метод активирования направленной экспрессии

Рисунок 7.52

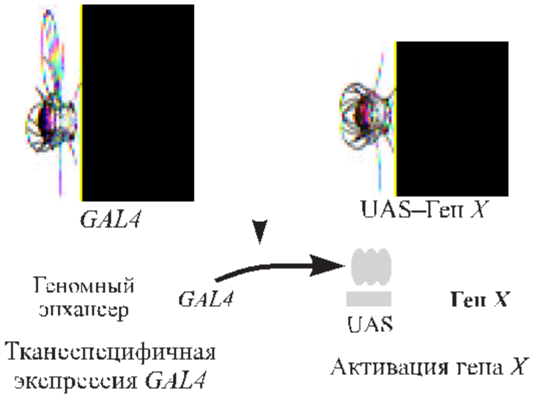


Схема активирования генов в системе транспозонов *GAL4* и UAS [Brand, Perrimon, 1993].

Ген *GAL4* встраивается под любой энхансер в геноме дрозофилы. В результате экспрессии гена *GAL4* синтезируется белок, который связывается с последовательностью UAS, активируя встроенный ниже ген *X*

генов у дрозофилы с использованием энхансеров. Суть его заключается в том, что исследователи создают две трансформированные линии мух. Для создания первой линии в *P*-элемент наряду с обычными маркерами вводится ген, кодирующий белок GAL4 (рис. 7.52). Такой транспозон встраивается в случайные районы хромосом дрозофилы, в том числе может попасть под какой-нибудь энхансер, например, под энхансер гена, работающего в клетках формирующегося крыла или ноги. Поэтому *GAL4* будет экспрессироваться в клетках крыла или ноги, однако никаких последствий для этих клеток не будет, поскольку белок GAL4 может активировать транскрипцию другого гена лишь в том случае, если он свяжется с промотором UAS, в нормальном развитии функционирующим также только в геноме дрожжей. Поэтому и создают вторую линию дрозофилы, которую трансформируют транспозоном, содержащим испытуемый ген *X*, сшитый с промотором UAS (см. рис. 7.52). Когда в результате скрещивания двух линий оба транспозона объединяются в геноме потомка, ген *GAL4* начинает функционировать в тех клетках, в которых активен его энхансер. Белок GAL4 связывается районом UAS, который и «включает» ген *X*. При этом индукция *X* будет наблюдаться совсем не в той ткани, в которой он активируется своим собственным энхансером, а в той, где функционирует энхансер гена *GAL4*. Такая экспрессия называется эктопической, т. е. «не на своем месте». Рассмотрим один из наиболее интересных примеров, связанных с использованием системы *GAL4*–UAS-транспозонов.

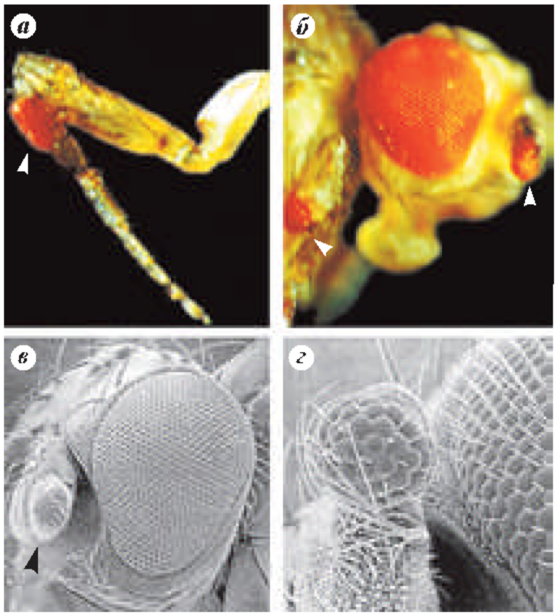
Рисунок 7.53

Вальтер Геринг
(р. 1939)

В лаборатории В. Геринга (рис. 7.53) заинтересовались развитием глаз у дрозофилы и некоторых других животных. Мутации некоторых генов, например *eyeless* у дрозофилы, приводят к полному отсутствию глаз. В результате сопоставления молекулярной организации генов *Aniridia* у человека, *Small eye* у мыши и *eyeless* у дрозофилы было найдено значительное их сходство. Это тем более удивительно, что анатомически глаза у мухи и млекопитающих очень мало напоминают друг друга: всем известный из учебников по анатомии глаз человека и сложный глаз, состоящий из 800 отдельных глазков (фасеток), собранных в один общий орган зрения, у дрозофилы. Оказалось возможным получить гибридный генотип — гомозигот по мутации *eyeless* у дрозофилы, содержащих транспозоны с *GAL4* и UAS. *GAL4* находится под контролем энхансера, функционирующего в клетках развивающихся ног, крыльев и органов головного комплекса. В транспозон, содержащий UAS, на место гена *X* встроена ДНК нормального аллеля гена *eyeless*. В результате функционирования гена *eyeless* появляются, во-первых, нормальные глаза, а также маленькие глаза в разных участках крыльев, ног, на голове — там, где был активен энхансер (рис. 7.54, *а*, *б*).

Затем был поставлен еще более смелый эксперимент: на место гена *X* в транспозон

Рисунок 7.54



Формирование глаз у трансформированных дрозофил:

а — эктопический глаз на ноге, *б* — на ноге и на антенне (дрозофилы трансформированы транспозонами, содержащими ген дрозофилы *eyeless*⁺) [Halder et al., 1995]; *в* — развитие нормального и эктопического глаза на антенне; *г* — то же, большое увеличение (мухи трансформированы транспозонами, содержащими ген *Small eye*⁺, выделенный из мыши) [Gehring, 1996]

с UAS встроили ДНК гена *Small eye*, выделенную из генома мыши. И опять начали формироваться сложные глаза, характерные для дрозофилы, в разных участках тела мухи (рис. 7.54, *в*, *г*). Как же могло получиться, что действие гена, контролирующего развитие глаза у мыши, привело к развитию глаза совершенно другого типа у дрозофилы? Согласно существующим расчетам, в процессах формирования глаз у животных принимает участие около 2,5 тыс. генов, и их действие организовано в каскад. Оказалось, что все три рассмотренных выше гена — *Small eyes, Aniridia* и *eyeless* — кодируют факторы транскрипции; они находятся в начале каскада, т. е только дают команду на начало развития глаза, а остальные гены, функционирующие после них, уже определяют, какой глаз будет сформирован.

Литература к разделу 7.6.3

Жимулёв И. Ф. Трансформация у дрозофилы — новый подход в генетике // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 7. С. 11–16.

Жимулёв И. Ф. Современные представления о структуре гена // Там же. С. 17–24.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 425.

Bellen H. J., O'Kane C. J., Wilson C. et al. P-element mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila* // Genes and Development. 1989. Vol. 3. P. 1288–1300.

Bier E., Vaessin H., Shepherd S., Lee K. et al. Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-*lacZ* vector // Ibid. P. 1273–1287.

Brand A. H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. Vol. 118. P. 401–415.

Gehring W. J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye // Genes to Cells. 1996. Vol. 1. P. 11–15.

Halder G., Callaerts P., Gehring W. J. New perspectives on eye evolution // Current Opinion in Genetics & Development. 1995. Vol. 5. P. 602–609.

Modolell J., Campuzano S. The *achaete-scute complex* as an integrating device // Int. J. Developmental Biology. 1998. Vol. 42. P. 275–282.

O'Kane K., Gehring W. J. Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila* // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1987. Vol. 84. P. 9123–9127.

Wilson C., Pearson R. K., Bellen H. J., O'Kane C. J., Grossniklaus U., Gehring W. J. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila* // Genes & Development. 1989. Vol. 3. P. 1301–1313.

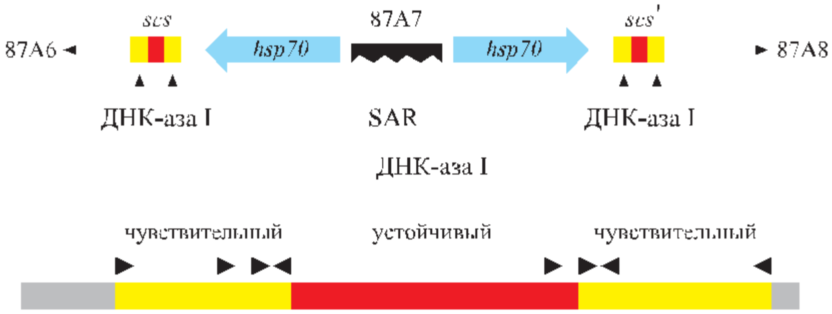
7.6.4. Инсуляторы

При рассмотрении вопроса об энхансерах, которые способны за счет петли соединиться с любым, даже очень удаленным промотором, можно было бы предположить, что любой конкретный промотор может находиться под контролем неограниченного числа энхансеров, разбросанных по всему геному. Однако этого не происходит, поскольку в геноме существуют особые структуры, называемые инсуляторами (от англ. insulate — изолировать, отделять от окружения). Инсуляторы разграничивают соседние гены, блокируя взаимодействия между энхансерами и неподходящими промоторами.

Лучше всего охарактеризованы инсуляторные элементы *scs* и *scs'* и фрагмент длиной в 340 пн, расположенный в пределах ретротранспозона *gypsy*.

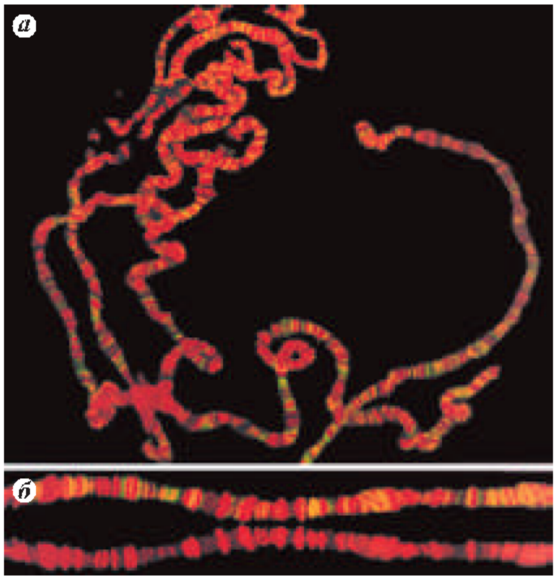
В пуфе теплового шока 87А7 у дрозофилы находятся две копии гена *hsp70*, по краям которых размещаются два элемента *scs* (specialized chromatin sequence) на расстоянии 14 тпн друг от друга [Udvardy et al., 1985; Kellum, Schedl, 1991]. Каждый элемент *scs* занимает примерно 350 пн (рис. 7.55). Оказалось, что с одним из *scs*-элементов связывается (по-ви-

Рисунок 7.55



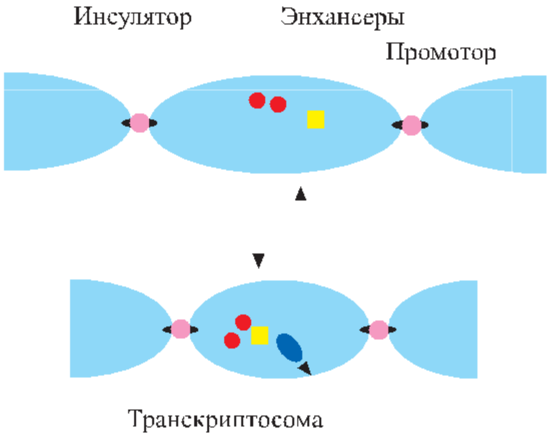
Структура инсуляторов в пуфе 87А7 [Zhao et al., 1995].
hsp70 — ген, кодирующий белки теплового шока; *scs* и *scs'* — инсуляторные элементы. Внизу в более крупном масштабе показано строение *scs*-элемента: ДНК-аза I-чувствительные участки и последовательности CGATA

Рисунок 7.56



Иммунолокализация белка BEAF в политенных хромосомах дрозофилы [Zhao et al., 1995]:
а — общий вид политенных хромосом, окрашенных пропидиум бромидом на ДНК (красная окраска), чтобы выявить диски (антитела на BEAF флуоресцируют зеленым цветом, при наложении окрасок образуется желтый цвет); *б* — локализация BEAF в междисках

Рисунок 7.57



Строение домена активирования гена между двумя инсуляторами [Vazquez, Schedl, 1994]

димому, через палиндром CGATA) специфический белок BEAF-32A (boundary element-associated factor). В политенных хромосомах белок BEAF локализован в междисках (50 % междисков связывают антитела) и по краям пуфов (рис. 7.56).

Инсуляторы обнаружены в системе глобиновых генов человека, в ретротранспозоне *gypsy* и в блоке генов *BX–C* у дрозофилы.

Полагают, что последовательности *scs* замыкают с двух сторон активные гены. Только в пределах участка между двумя инсуляторами энхансерные последовательности, связавшись с белками-активаторами, могут образовать петлю и осуществить взаимодействие с промотором (рис. 7.57).

Литература к разделу 7.6.4

Avramova Z., Tikhonov A. Are *scs* and *scs'* «neutral» chromatin boundaries of the 87A7 locus *in vivo*? // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15. P. 138–139.

Bell A. C., West A. G., Felsenfeld G. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome // Science. 2001. Vol. 291. P. 447–451.

Cai H. N., Shen P. Effects of cis arrangement of chromatin insulators on enhancer-blocking activity // Ibid. P. 493–495.

Gerasimova T. I., Byrd K., Corces V. G. A chromatin insulator determines the nuclear localisation of DNA // Molecular Cell. 2000. Vol. 6. P. 1025–1035.

Kellum R., Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains // Cell. 1991. Vol. 64. P. 941–950.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 674–678.

Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E. et al. Loss of insulator activity by paired Su(Hw) chromatin insulator // Science. 2001. Vol. 291. P. 495–497.

Udvardy A., Maine E., Schedl P. The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains // J. Mol. Biol. 1985. Vol. 185. P. 341–358.

Vazquez J., Schedl P. Sequences required for enhancer blocking activity of *scs* are located within two nuclease-hypersensitive regions // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 5984–5993.

Zhao K., Hart C. M., Laemmli U. K. Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32 // Cell. 1995. Vol. 81. P. 879–889.

7.7. СТРУКТУРНАЯ ЧАСТЬ ГЕНА

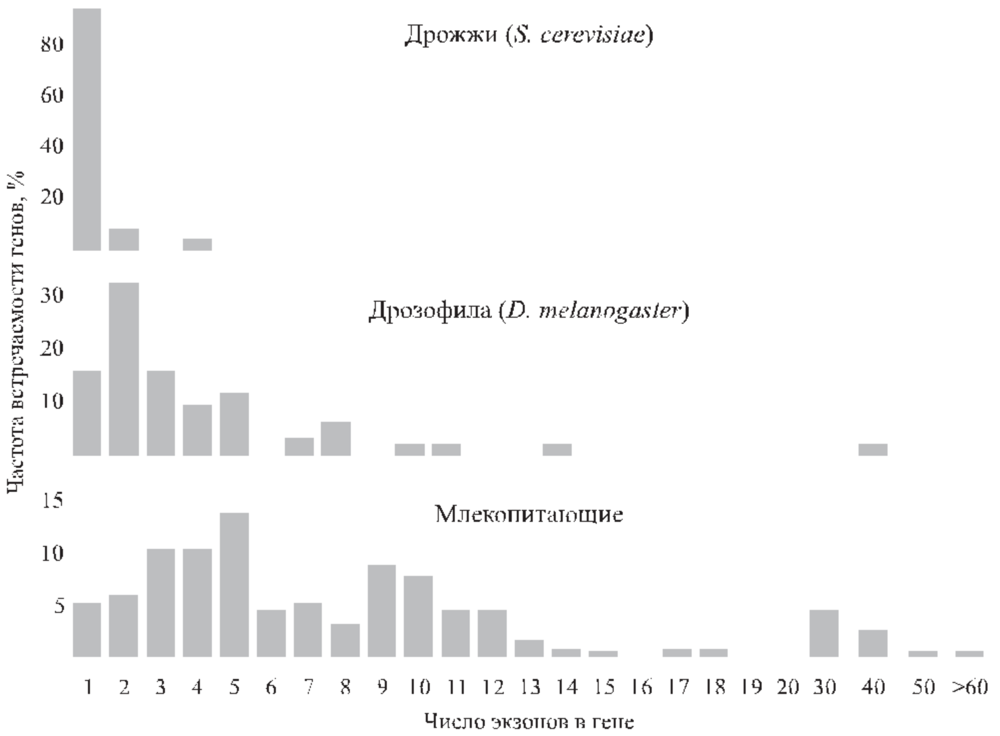
7.7.1. Интроны и экзоны

При изучении первичной структуры, т. е. последовательности нуклеотидов, ряда генов выяснилось, что в них, наряду с участками, кодирующими специфичный для этого гена продукт (полипептид, рРНК, тРНК и т. д.), имеются участки, которые ничего не кодируют, т. е. они подобно межгенным спейсерам (участкам между генами) не содержат генетической информации. Группы ученых, возглавляемых Р. Робертсом и Ф. Шарпом, обнаружили такие расщепленные гены у аденовируса 2 в 1977 г.

Некодирующие участки получили название интронов, кодирующие — экзонов. Такой тип структурной организации обнаружен для множества генов, локализованных в хромосомах эукариот, для некоторых генов внутриклеточных органелл эукариот — пластид и митохондрий, а также для генов нескольких РНК-содержащих и ДНК-содержащих вирусов, поражающих эукариот. У бактерий интронов в генах нет. Нет интронов и в генах вирусов, поражающих бактерии.

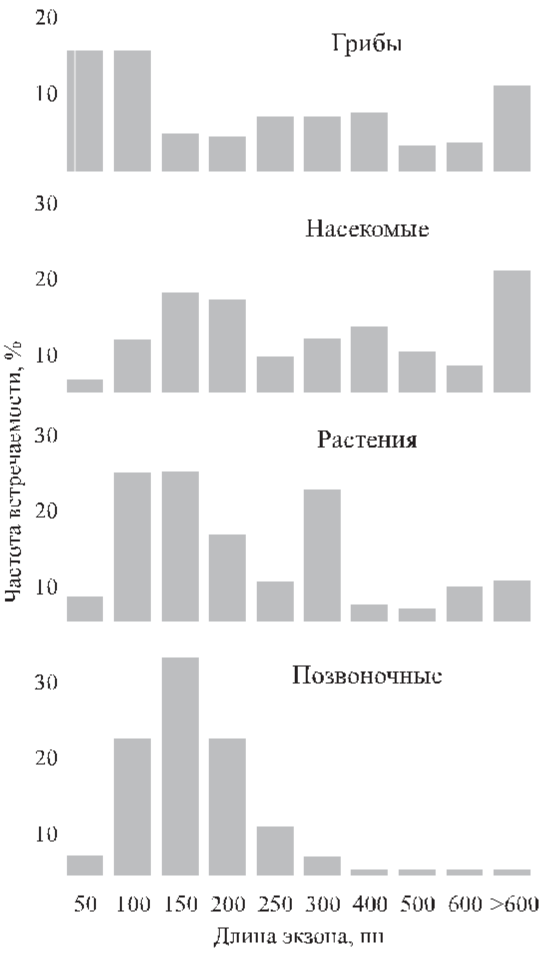
Число и внутригенная локализация интронов характерны для каждого гена, что стано-

Рисунок 7.58



Распределение частот генов, имеющих различное число экзонов [Lewin, 1994. P. 684]

Рисунок 7.59

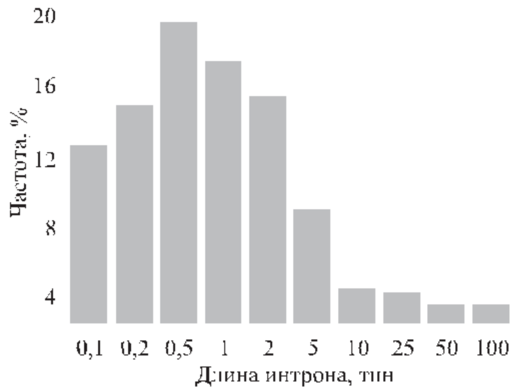


Длина экзонов в генах у разных представителей животного и растительного мира [Lewin, 1994. P. 683]

вится очевидным в результате сравнения организации гомологичных генов у разных видов.

Некоторые гены содержат только один-два интрона, но часто их значительно больше. Так, например, в гене овальбумина курицы 7 интронов, в гене сывороточного альбумина крысы их 13, а один из генов коллагена курицы имеет даже 51 интрон. По результатам проекта «Геном человека», в 17 тыс. исследованных транскриптов у этого вида среднее число экзонов на транскрипт составило 7,8 [Venter et al., 2001]. Детальное исследование экзонов у 10 наиболее

Рисунок 7.60



Длина интронов в генах позвоночных [Lewin, 1994. P. 683]

изученных модельных объектов показало, что у эукариот в среднем один ген содержит 3,7 интрона на 1 тпн кодирующего участка ДНК [Deutsch, Long, 1999].

У низших эукариот, таких как дрожжи, 95 % генов содержат только один экзон, значит, такие гены не прерываются интронами. У дрозофилы таких генов всего 17 %, а у млекопитающих — 6 % (рис. 7.58).

Экзоны имеют, как правило, небольшую длину (рис. 7.59).

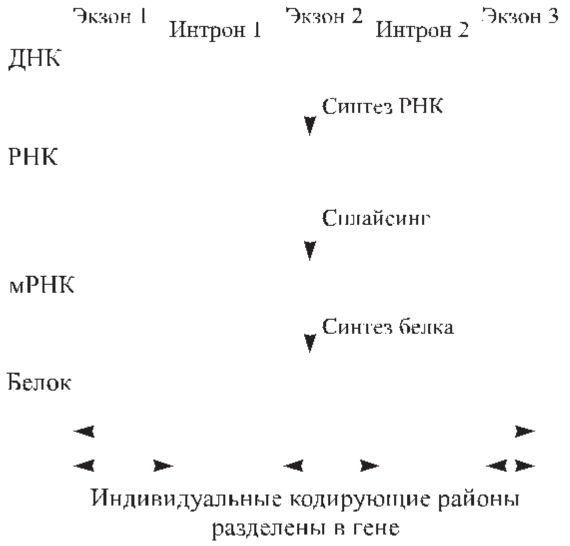
Длина интрона может быть разной — от нескольких десятков пар нуклеотидов до многих тысяч (рис. 7.60). Общая длина всех интронов часто значительно превышает суммарную длину экзонов. К примеру, из приблизительно 7 тпн, образующих ген овальбумина, на долю экзонов приходится всего 1872 пн, т. е. почти 3/4 длины составляют интроны. По данным проекта «Геном человека», только 1 % ДНК генома приходится на экзоны и 24 % — на интроны, при этом размер гена (экзоны + интроны) составляет около 28 тпн [Venter et al., 2001].

Интроны транскрибируются наравне с экзонами, так что про-мРНК содержит участки, транскрибированные как с экзонов, так и с интронов. В дальнейшем в ходе процессинга, происходящего в ядре, участки про-мРНК, соответствующие интронам, вырезаются, а бывшие разобщенными участки, считанные с экзонов, «сращиваются», и зрелая мРНК содержит только транскрипты экзонов. Эти прежде разобщенные участки соединяются в нужном порядке (рис. 7.61). Воссоединение участков, транскрибированных с экзонов при образовании зрелой мРНК, называют сплайсингом (от англ. splicing — сращивание морских канатов). Длина гена существенно больше длины мРНК (табл. 7.1).

Дополнение 7.6

Нобелевская премия 1993 г. была присуждена Ф. А. Шарпу (Philip A. Sharp) и Р. Дж. Робертсу (Richard J. Roberts) за открытие расщепленных генов.

Рисунок 7.61



Процесс передачи информации от ДНК к белку, кодируемому расщепленным геном [Lewin, 1994. P. 150]

Интроны всегда (установлено для генов, кодирующих белки) имеют на 5'-конце пару последовательностей GT, а на 3'-конце — AG.

Последовательности нуклеотидов в экзонах консервативны, а в интронах сильно варьируют. Иногда экзон одного гена может быть гомологичным экзону даже другого гена. Например, два β-глобиновых гена мыши имеют по три гомологичных экзона в каждом гене. Между интронами этих генов гомология не найдена, по-видимому, из-за того, что интроны эволюционируют значительно быстрее, чем экзоны. При сравнении последовательностей нуклеотидов в одних и тех же генах у разных видов находят большую гомологию в экзонах.

Таблица 7.1. Соотношение длины гена и матричной РНК в зависимости от числа экзонов [Lewin, 1994. P. 687]

Виды	Среднее число экзонов	Средняя длина гена (тпн)	Средняя длина мРНК (тпн)
Saccharomyces cerevisiae	1	1,6	1,6
Грибы	3	1,5	1,5
Cenorhabditis elegans	4	4,0	3,0
Drosophila melanogaster	4	11,3	2,7
Куры	9	13,9	2,4
Млекопитающие	7	16,6	2,2

Разные экзоны в пределах гена не только различаются по составу кодируемых ими аминокислот, но и имеют определенные структурные особенности. Например, в геноме человека обнаружено 30–45 тыс. так называемых CpG-островков. Это тяжи неметилированной ДНК с высоким содержанием динуклеотидов CpG. Чаще всего они располагаются в районах стартовых точек транскрипции. Вероятность найти CpG-островки в первых экзонах генов человека в 13 раз выше, чем в интронах, и в два раза выше, чем в других экзонах.

Литература к разделу 7.7.1

Deutsch M., Long M. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms // Nucl. Acids Res. 1999. Vol. 27. P. 3219–3228.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 688–689.

Venter J. C. et al. The sequence of the human genome // Science. 2001. Vol. 291. P. 1304.

7.7.2. Альтернативный сплайсинг

В некоторых случаях в аминокислотные последовательности транслируются не все существующие экзоны. В результате с одного гена считывается более одного типа мРНК. По мнению некоторых авторов, наличие альтернативного сплайсинга может объяснять кажущееся несоответствие между числом генов и сложностью организма, поскольку один ген может давать много разных транскриптов [Graveley, 2001].

На рис. 7.62 суммированы возможные механизмы образования многих типов молекул РНК, считываемых с одного гена: за счет изменения инициации и терминации транскрипции, а также сплайсинга. Использование альтернативных промоторов может изменять 5'-конец, использование альтернативных терминаторов — 3'-конец транскрипта. Эти изменения могут возникать только за счет инициирующих или терминальных последовательностей мРНК. Иногда изменения в нетранслируемой лидерной 5'-последовательности или нетранскрибируемой трэйлерной 3'-последовательности могут влиять на экспрессию гена.

На рис. 7.63 представлена схема альтернативного сплайсинга в гене *BR-C* у дрозофилы. Весь ген занимает около 120 тпн, в нем выделяют 10 экзонов. Обнаружено более 15 типов различных мРНК.

Возможен другой тип альтернативного сплайсинга, когда один ген функционирует фактически как два (рис. 7.64).

Альтернативный сплайсинг играет огромную роль в генетическом определении пола.

Рисунок 7.62

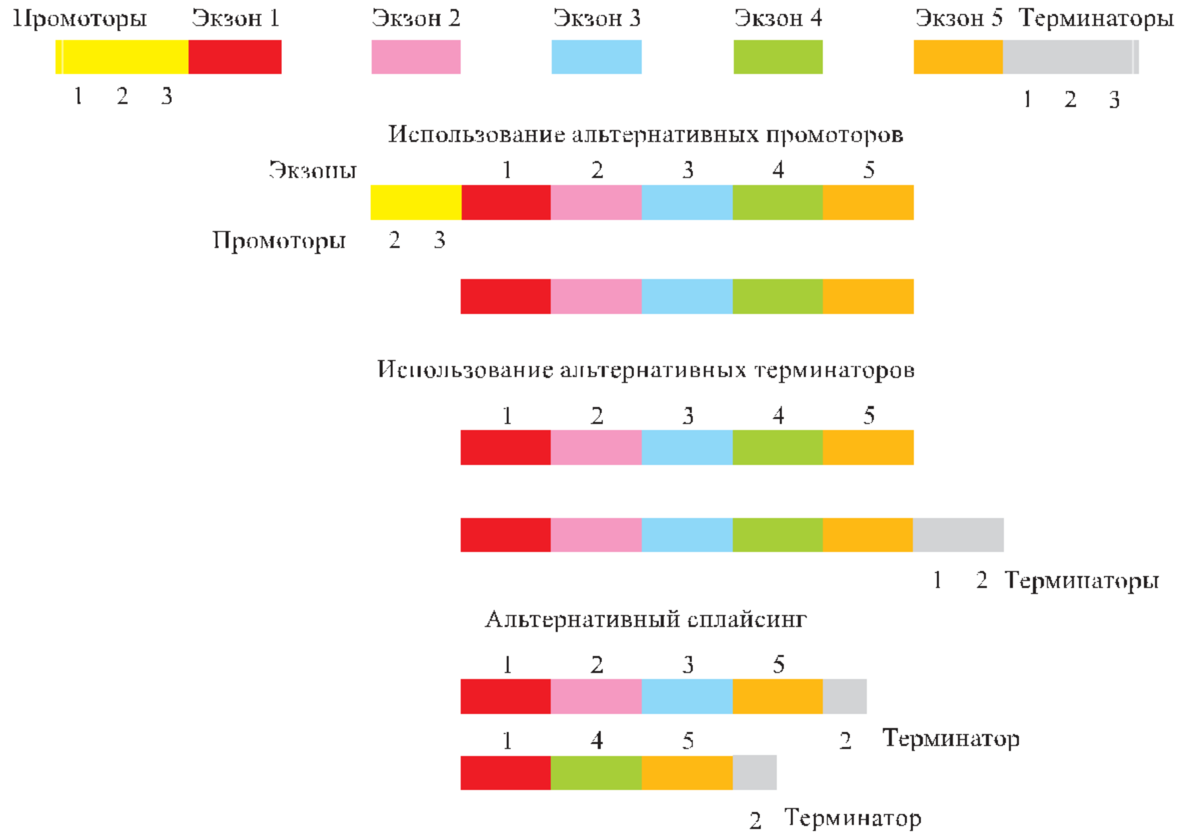
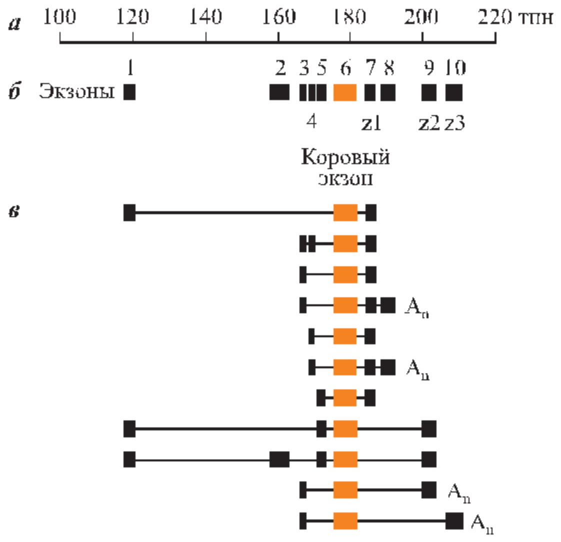


Схема возможных вариантов альтернативного сплайсинга [Lewin, 1994. P. 688]

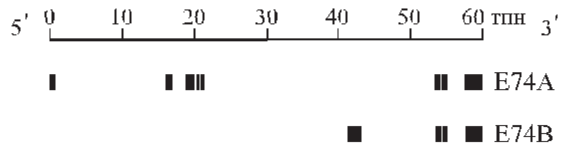
Рисунок 7.63



Организация транскрипции гена *BR-C* у *D. melanogaster* [DiBello et al., 1991. — Из: Жимулёв, 1994. С. 284]:

а — физическая карта гена; *б* — расположение экзонов на физической карте; *в* — различные транскрипты, возникающие за счет альтернативного сплайсинга

Рисунок 7.64

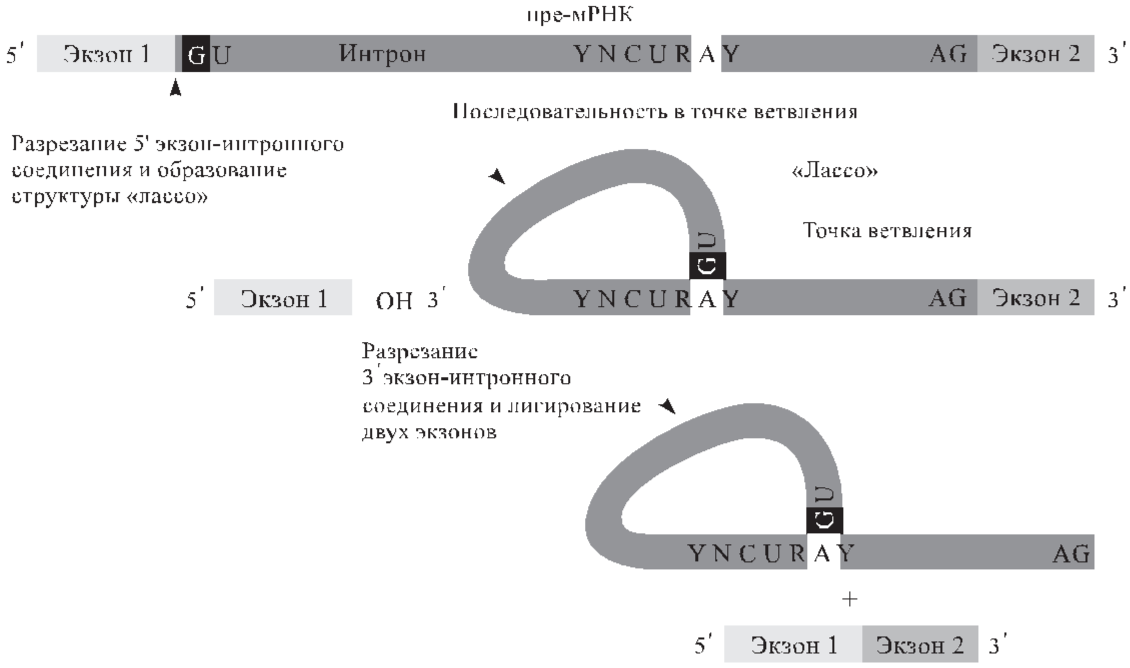


Структура гена *E74*, расположенного в пуфе 74EF [Karim, Thummel, 1991. — Из: Жимулёв, 1994. С. 293].

E74A, E74B — транскрипты, синтезирующиеся одновременно с двух разных промоторов

На рис. 7.65 представлена последовательность событий при сплайсинге экзонов и вырезании интрона между ними. Первым шагом является расщепление в 5'-положении интрона, что приводит к отделению экзона 1 от молекулы РНК, содержащей интрон и экзон 2. 5'-конец интрона образует петлю и соединяется с нуклеотидом А, входящим в последовательность, называемую участком разветвления (branch-point sequence) и расположенную выше 3'-конца интрона. Эта петлеобразная структура на-

Рисунок 7.65



Процесс удаления интрона из молекулы пре-мРНК [Russell, 1998. P. 398]

зывается «лассо». В клетках млекопитающих участок разветвления содержит консервативную последовательность (консенсус) YNCURAY, где Y — пиримидин, R — пурин, а N — любое основание. Ключевой А-нуклеотид в этой последовательности расположен в положении 18–28 пн выше 3'-конца интрона. У дрожжей этой последовательностью является UACUAAC. Интрон удаляется в форме «лассо» (см. рис. 7.65).

Сплайсинг происходит в особых структурах, называемых сплайсеосомами (рис. 7.66) и состоящих из пре-мРНК, связанной с частицами малых ядерных рибонуклеопротеинов (snRNP, иногда ученые называют их snurps).

Литература к разделу 7.7.2

Гвоздев В. А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // Соросовский образовательный журн. 1996. № 12. С. 11–18.

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 284–293.

Graveley B. R. Alternative splising: increasing diversity in the proteomic world // Trends in Genetics. 2001. Vol. 17, № 2. P. 100–107.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 150, 687–688.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 685–718.

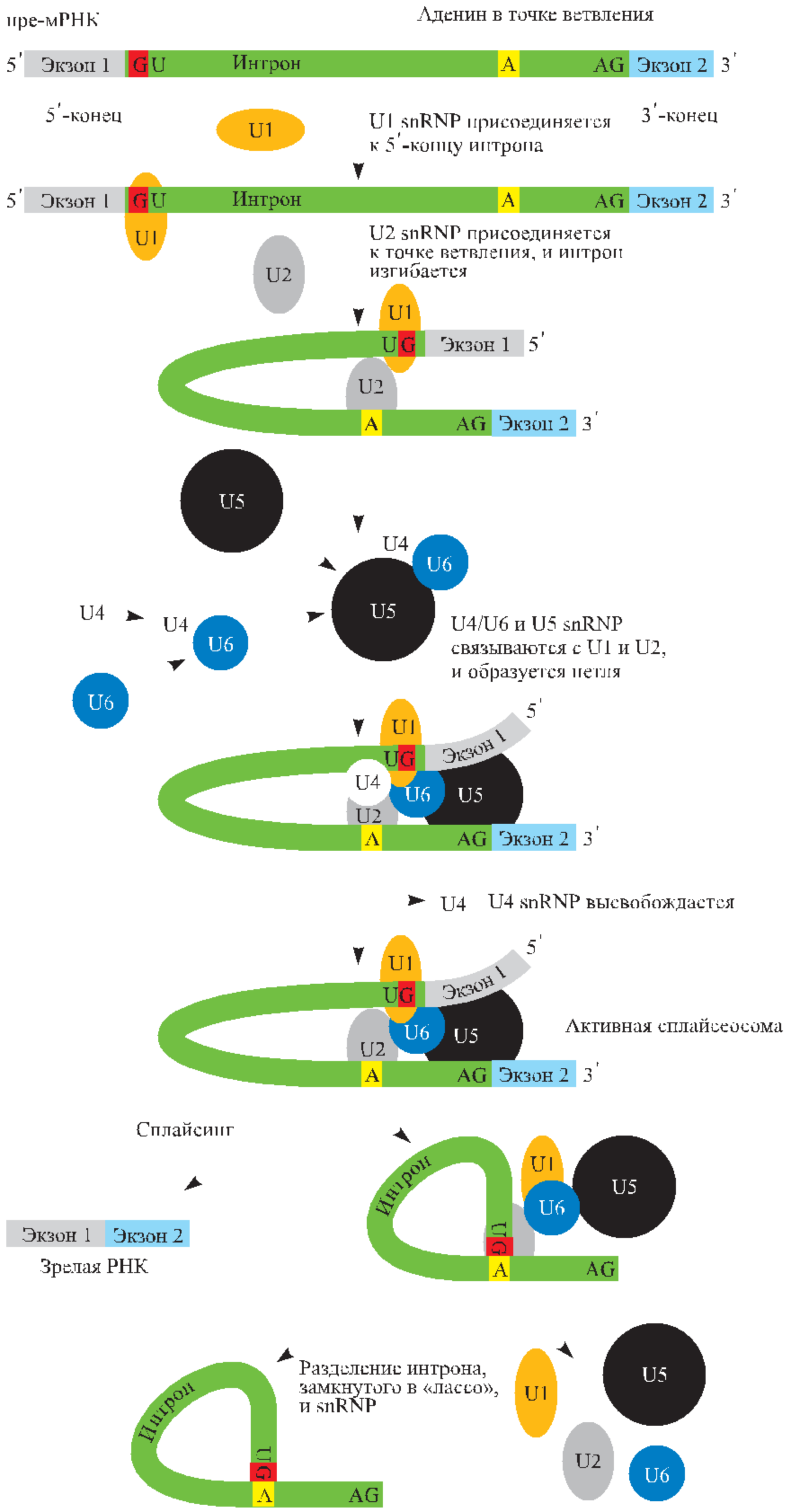
Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 398–399.

7.7.3. Процессинг геномной ДНК у ресничных инфузорий

Удивительное явление, напоминающее альтернативный сплайсинг, открыл Д. Прескотт (рис. 7.68). Одноклеточные организмы класса Ciliata содержат два сорта ядер: диплоидный микронуклеус, относящийся к зародышевому пути, и соматический макронуклеус. Микронуклеарная ДНК имеет большую длину, сравнимую с длиной хромосом у других эукариот. В ней расположены гены, отделенные друг от друга большими участками межгенной ДНК. Эти участки составляют до 95 % всей геномной ДНК. Кодирующие части (MDS) этой ДНК разделены интронами и особыми фрагментами, называемыми IES (внутренние элиминируемые последовательности, internal eliminated segments). Они имеют длину 100–600 пн и на 70–100 % состоят из А–Т-пар. Таких IES в геноме содержится 100–200 тыс. Кодирующие участки MDS микронуклеарной ДНК перемешаны, поэтому гены в микронуклеусе неактивны.

Во время созревания макронуклеуса у инфузорий происходит удаление IES и внутригенных последовательностей без синтеза РНК. Более того, происходит перестановка фрагментов MDS. Так, в ДНК микронуклеуса MDS гена актина I у *Oxytricha nova* расположены в последовательности: 3–4–6–5–7–9–2–1–8. После удаления IES они занимают положение

Рисунок 7.66



Модель формирования сплайсеосомы и удаления интрона [Russell, 1998. P. 399]

Рисунок 7.67

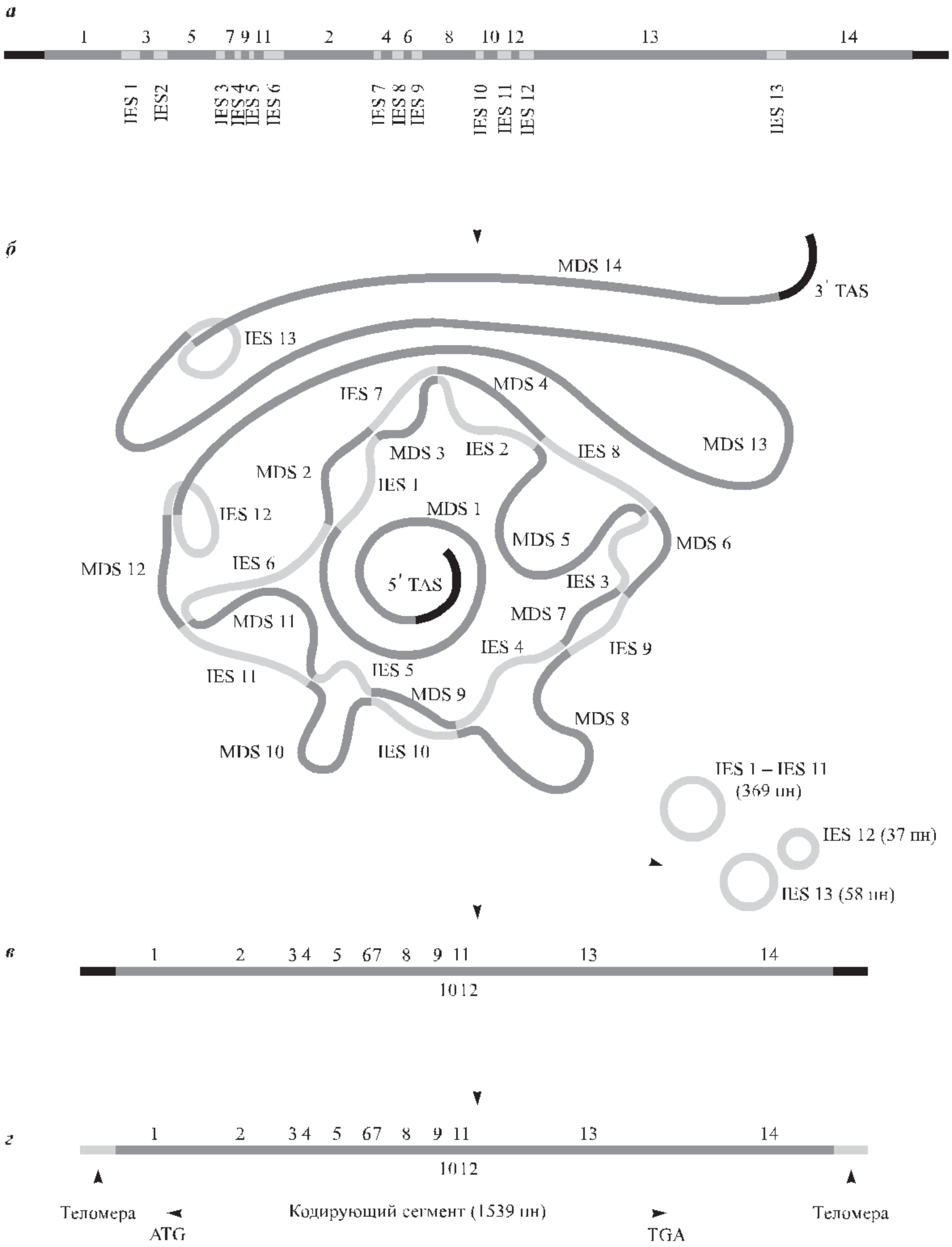
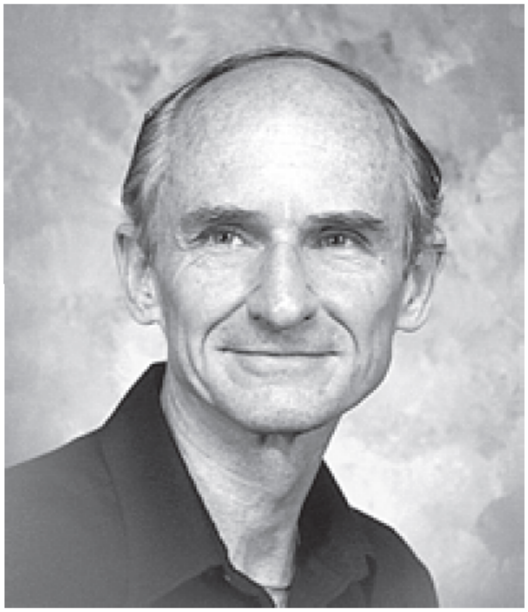


Схема «созревания» гена α*TBP* у *Oxytricha nova* [Prescott, 1992]:

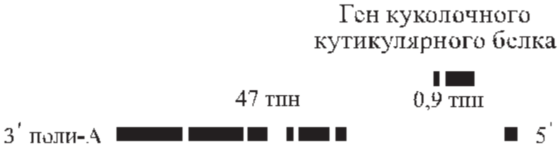
а — микронуклеарный вариант гена, содержащего 14 кодирующих элементов (последовательностей, предназначенных для макронуклеуса — MDS) и 13 интроноподобных (внутренних элиминируемых последовательностей — IES); *б* — возможная картина образования ДНК-петель для считывания последовательных MDS; *в* — последовательность MDS после созревания макронуклеуса; *г* — зрелый ген с добавленными теломерами. TAS — субтеломерная последовательность

Рисунок 7.68



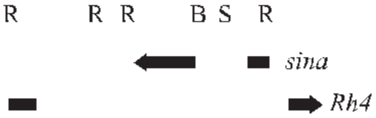
Дэвид Прескотт
(р. 1926)

Рисунок 7.69



Экзон-интронная карта гена *Gart* и расположенного в его интроне гена куколочного кутикулярного белка дрозофилы [Henikoff et al., 1986. — Из: Жимулёв, 1994. С. 147]

Рисунок 7.70



Расположение гена *sina* в интроне гена *Rh4* дрозофилы [Carthew, Rubin, 1990. — Из: Жимулёв, 1994. С. 148].
Вверху — рестрикционная карта района

в ряду с 1 по 9, и только такая их последовательность дает функциональный белок [см. подробнее: Prescott, 1992, 2000].

Еще более впечатляет реорганизация гена α*TBP*, который в микронуклеусе содержит 14 MDS, расположенных в следующем порядке: 1–3–5–7–9–11–2–4–6–8–10–12–13–14, а нормальный по нумерации порядок кодирующих частей образуется в созревшем макронуклеусе (рис. 7.67).

Обнаружены совсем уж удивительные по перестроенности гены, например ген, кодирующий ДНК-полимеразу у *Oxytricha nova*. В микронуклеусе он состоит из 45 участков, полностью перемешанных между собой и даже ориентированных в противоположных направлениях. И только во время созревания ДНК макронуклеуса MDS выстраиваются в нужном порядке от 1 до 45 [Prescott, 2000].

Литература к разделу 7.7.3

Prescott D. M. The unusual organization and processing of genomic DNA in hypotrichous ciliates // Trends in Genetics. 1992. Vol. 8. P. 439–445.

Prescott D. M. The DNA of ciliated protozoa // Microbiol. Rev. 1994. Vol. 58. P. 233–267.

Prescott D. M. The evolutionary scrambling and developmental unscrambling of germline genes in hypotrichous ciliates // Nucl. Acids Res. 1999. Vol. 27. P. 1243–1250.

Prescott D. M. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in Ciliates // Nature Rev. Genetics. 2000. Vol. 1. P. 191–198.

7.7.4. Локализация генов в интронах

В интронах некоторых генов располагаются другие гены (рис. 7.69–7.70). По результатам проекта «Геном дрозофилы», 8 % генов у этого вида локализованы в интронах других генов [Ashburner, 1999].

Удивительным по сложности организации и размеру интронов является ген *dnc* у *D. melanogaster*. Ген занимает минимум 130 тпн (от –90 до +40 тпн) и содержит 13 экзонов. Между первыми двумя экзонами, находящимися на расстоянии около 40 тпн, расположено несколько генов из семейства *Pig*/*Sgs*. Между вторым и третьим экзоном (около 70 тпн) лежат еще 4 гена (рис. 7.71).

Литература к разделу 7.7.4

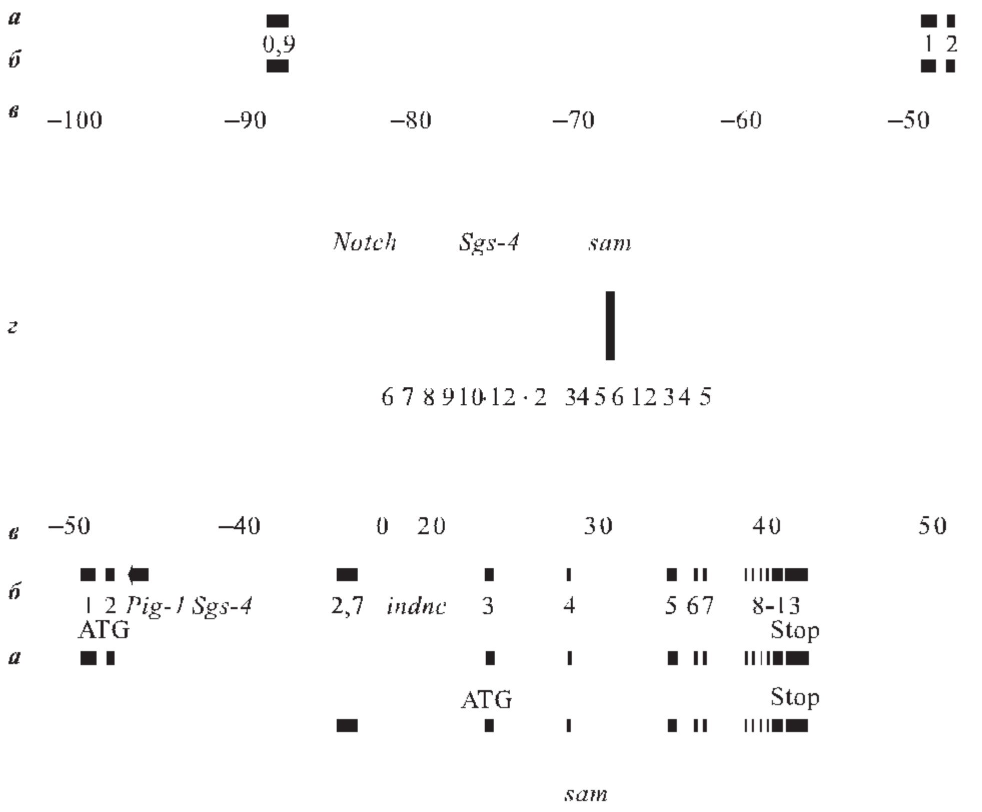
Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 147–149.

Ashburner M. Genome project in *Drosophila* // Abstracts of the 16th European Drosophila Research Conference, 1999.

7.7.5. Изучение структурной части гена с помощью трансформации

Организацию и экспрессию структурной части генов можно изучать, объединяя их в конструкцию с известным промотором и трансформируя дрозофил, мутантных по этому гену. Для этих целей часто используют промоторы

Рисунок 7.71



Структура гена *dunce* у *D. melanogaster* [Davis, Dauwalder, 1990. — Из: Жимулёв, 1994. С. 149]:
а — карта интронов и экзонов гена *dunce* (*dnc*); *б* — карта других генов, расположенных в интронах гена *dunce*; *в* — физическая карта ДНК в районе хромосомы 3С; *г* — участок хромосомы 3С6–3Е5

генов теплового шока. В нормальном развитии эти промоторы не функционируют, но активируются при резком повышении температуры (обработка при температуре 37 °С, 40 мин).

Ген под действием шока начинает экспрессироваться, о чем можно судить по «исправлению» мутантного фенотипа, появлению нормального белка или РНК [см. подробнее: Lawrence, 1992].

Литература к разделу 7.7.5

Lawrence P. A. The making of fly. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. P. 55.

7.7.6. Участки, терминирующие транскрипцию

Терминация транскрипции прокариотических генов обусловлена элементами, называемыми терминаторами. Одним из важных белков, вовлеченных в терминацию транскрипции некоторых генов у *E. coli*, является белок ρ. Терминаторы в таких генах называются ρ-зависимыми (или терминаторы II типа). Во многих других терминаторах коровая РНК-полимераза сама может осуществлять терминацию. Терминаторы такого типа называются ρ-независимыми (I типа). ρ-Независимые терминаторы состоят из последовательностей, расположенных за 16–20 пн от точки терминации и представляющих собой инвертированный повтор (рис. 7.72).

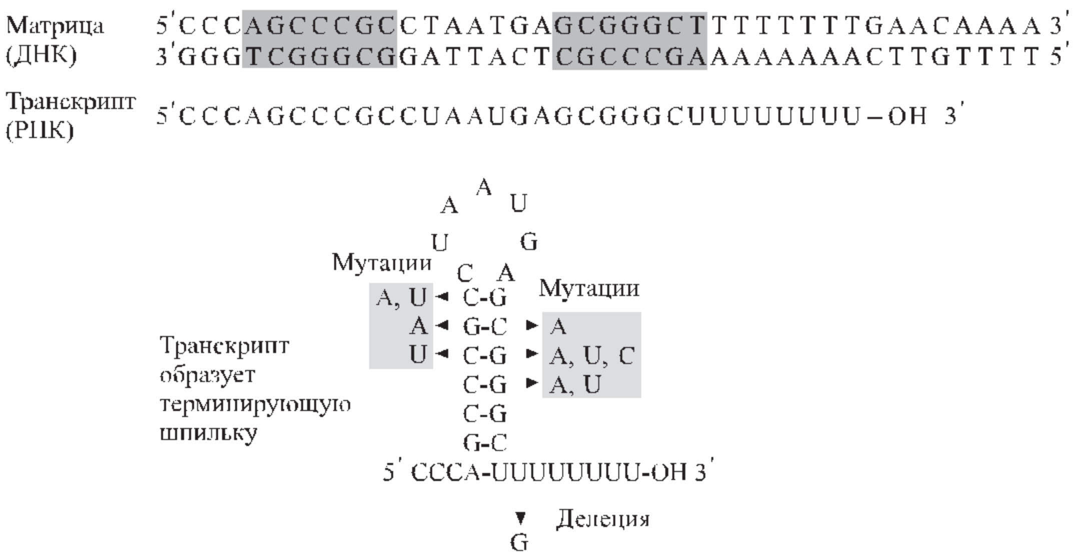
Эта последовательность замыкается нитью из 4–8 А(Т)-нуклеотидов, на которой синтезируется U-последовательность. ρ-Зависимые терминаторы не имеют А(Т)-нити и во многих случаях не формируют шпилечных структур. ρ-Фактор — это белок с двумя доменами: один связывается с РНК, другой — с АТР.

Три ключевых события происходят на терминаторах обоих типов: 1) останавливается синтез РНК; 2) цепь РНК освобождается от ДНК; 3) РНК-полимераза освобождается от ДНК.

Литература к разделу 7.7.6

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 388.

Рисунок 7.72



Последовательность нуклеотидов в ρ-независимом терминаторе транскрипции и структура терминируемой РНК [Russell, 1998. P. 388].

Мутации в затемненных участках полностью предотвращают терминацию

7.8. ГОМОЛОГИЯ ГЕНОВ

О гомологии генов свидетельствует закон гомологических рядов Н. И. Вавилова: одинаковые мутации возникают в одинаковых генах.

Молекулярно-генетические данные свидетельствуют о значительной гомологии генов «домашнего хозяйства» (гены гистонов, рибосомных РНК), белков теплового шока.

Во многих случаях гомологией обладают отдельные домены, например гомеодомен, хромодомен и т. д.

7.9. ПСЕВДОГЕНЫ

Иногда в геномах встречаются так называемые псевдогены. Они имеют все необходимые черты генов, т. е. полный набор экзонов, характерных для каких-то генов, полиA(T)-хвосты и короткие прямые повторы длиной 10–20 пн (как у мобильных элементов), однако остаются функционально неактивными. Существуют 2 типа псевдогенов:

1. Традиционные псевдогены (семейство генов глобинов — см. разд. 7.10). Они возникают за счет дупликаций определенных генов, которые затем выключаются в результате делеций и точковых мутаций.

2. Процессированные псевдогены. У них нет интронов, но есть остатки поли$(A)^+$-тракта; по флангам чаще всего находят прямые повторы. Такие псевдогены часто встречаются у млекопитающих и редко — у дрожжей.

У дрозофилы псевдогены встречаются редко, чаще это гены транспортных или малых ядерных РНК (тРНК, snRNA). Еще один известный пример — псевдоген личиночного кутикулярного белка и псевдоген *Adh* у *D. mulleri*, они сохраняют свои интроны. Пример процессированного псевдогена (т. е. без интронов) описан для гена *Adh* у *D. teissieri* и *D. yakuba.*

В геноме человека, как полагают, не менее 3 тыс. последовательностей можно рассматривать в качестве псевдогенов [Venter et al., 2001].

Литература к разделу 7.9

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 86–100.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 1051–1055.

Venter J. C. The sequence of the human genome // Science. 2001. Vol. 291. P. 1304.

7.10. РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ В ХРОМОСОМАХ ЭУКАРИОТ

У эукариот не распространен оперонный тип расположения генов, т. е. объединение в блоки генов, находящихся под общим контролем. Гены, контролирующие даже последовательные биохимические реакции, расположены в разных районах хромосомы и даже в разных хромосомах. Например, у дрозофилы многие гены, кодирующие ферменты, под контролем которых происходит превращение триптофана в бурый глазной пигмент, разбросаны во множестве участков генома.

Вместе с тем известны некоторые примеры кластерной организации генов. У человека существует несколько типов гемоглобинов. Каждый из них синтезируется на определенной стадии развития. Например, гемоглобины ζ и ε вырабатываются в клетках эмбрионального желточного мешка. В это время молекула белка состоит из двух цепей α-подобного ζ-гемоглобина и двух цепей ε (β-подобный). К концу третьего месяца развития синтез гемоглобина этого типа заканчивается и начинается синтез фетального (утробного) гемоглобина в клетках печени и селезенки. Фетальный гемоглобин состоит из двух α-полипептидов и двух γ (β-подобных): двух γA или двух γG. Во время постэмбрионального развития гемоглобин синтезируется в клетках костного мозга и состоит из α- и β-полипептидов и некоторого количества β-подобного δ-полипептида. Большая часть гемоглобина в крови взрослого человека представляет собой тетрамер $\alpha2\beta2$ (Hb-A).

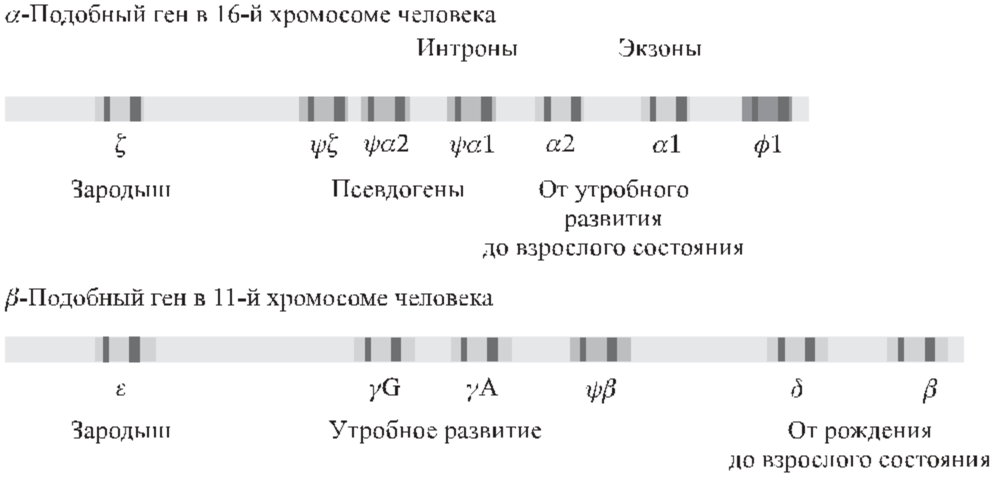
В геноме человека гены гемоглобина расположены двумя кластерами: все α-подобные гены собраны в хромосоме 16, в то время как все β-подобные гены — в хромосоме 11 (рис. 7.73). В каждом кластере есть псевдогены.

Интересно, что гены вдоль по хромосоме расположены в том порядке, в каком они включаются в работу в ходе онтогенеза. Однако каких-либо данных, свидетельствующих об их функциональной сцепленности или общем контроле по принципу оперонной организации, не получено. Тот факт, что эти гены функционируют в разных тканях и на разных этапах онтогенеза, скорее свидетельствует о независимом контроле экспрессии этих генов.

Гены транспортной РНК у дрозофилы расположены во многих районах по 1–2 гена в каждом. Однако в одном из районов 16 генов занимают небольшой участок длиной 50 тпн (рис. 7.74), хотя их транскрипция не контролируется одним промотором.

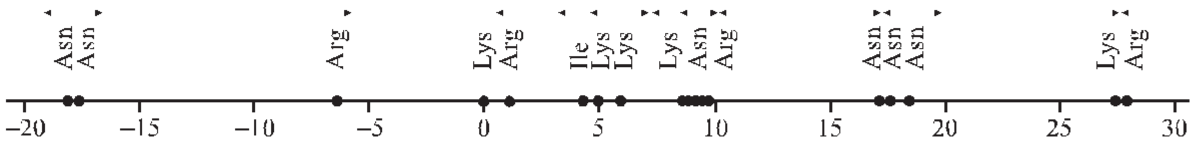
Организация генов 18S и 28S рРНК у всех эукариот в общих чертах одинаковая. Гены 18S, 5,8S и 28S рРНК, лидерная последовательность, а также транскрибируемый и нетранскрибируемый спейсеры составляют единицу длиной около 11 тпн (рис. 7.75), которая повторена несколько сот раз. Как правило, число копий варьирует в пределах от 100 до 1000: у дрожжей — 140 повторов, у дрозофилы — 200–250, у человека — 1250. Лидерная последовательность расположена перед геном 18S, и с нее начинается транскрипция. Каждая единица повтора генов рРНК считывается РНК-полимеразой I от лидерной последовательности до конца гена 28S рРНК в виде одного

Рисунок 7.73



Кластеры глобиновых генов в хромосомах 16 и 11 человека и стадии развития, на которых они экспрессируются [Russell, 1998. P. 562]

Рисунок 7.74



Расположение генов транспортных РНК в районе 42А 2R-хромосомы *D. melanogaster* [Kubli, 1982. — Из: Жимулёв, 1994. С. 117].

Цифрами под горизонтальной линией обозначен масштаб (в тпн)

Рисунок 7.75

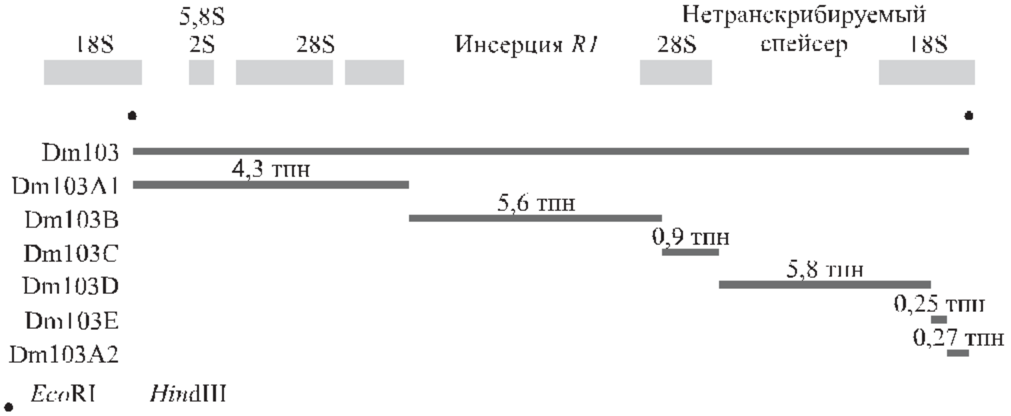


Схема организации повторяющейся единицы в кластере генов 18S и 28S рРНК у дрозофилы [Peacock et al., 1981. — Из: Жимулёв, 1994. С. 394].

Единица содержит гены 18S и 28S рибосомной РНК, транскрибируемый (занятый последовательностью 5,8S) и нетранскрибируемый спейсеры. Значительная часть (до 48 %) генов 28S рРНК содержит инсерции мобильного (*R1*) элемента

цистрона. Участок ДНК между генами 18S и 28S транскрибируется вместе с этими генами и называется транскрибируемым спейсером. В нем расположены короткие последовательности, которые выделяются из общего транскрипта в ходе процессинга РНК. У млекопитающих и амфибий в коротком спейсере формируется 5,8S РНК — небольшая молекула, образующая водородную связь с 28S рРНК в рибосоме.

Самая короткая транскрипционная единица рРНК у бактерий, у которых при общей длине транскрипта 6 тпн 80 % приходится на кодирующую часть. У эукариот длина транскрипта составляет 7–8 тпн и кодирующая часть занимает 70–80 %. В ходе созревания рРНК лидирующая последовательность и часть транскрибируемого спейсера, не кодирующая 5,8S РНК, деградируют до нуклеотидов.

Транскрибируемые единицы разделяются участком ДНК, называемым нетранскрибируемым спейсером (НТС). Его длина варьирует в широких пределах: от 1750 пн у дрожжей до 30 тпн у мыши, у дрозофилы он имеет длину 3750–6450 пн. В самом НТС обнаружили внутренние повторы, которые, в частности у дрозофилы, играют существенную роль в мейотическом спаривании *X*- и *Y*-хромосом. Существенная часть генов 28S рРНК содержит инсерции (см. рис. 7.75).

Каждая из единиц повтора может функционировать независимо от других. Если один из повторов заключить в *P*-элемент и с помощью трансформации ввести его опять в геном дрозофилы, в участке встраивания транспозона образуется маленькое ядрышко, возникшее в результате транскрипционной активности этого повтора.

У дрозофилы гены, кодирующие 5S рРНК, представлены блоком, включающим 160–200 идентичных последовательностей длиной 385 пн каждая. Общая длина кластера составляет 60–80 тпн. Повторяющаяся единица состоит из кодирующей части (~135 пн) и спейсера (250 пн). Отдельные гены или группы генов в пределах кластера транскрибируются независимо друг от друга: делеции части ге-

Рисунок 7.76

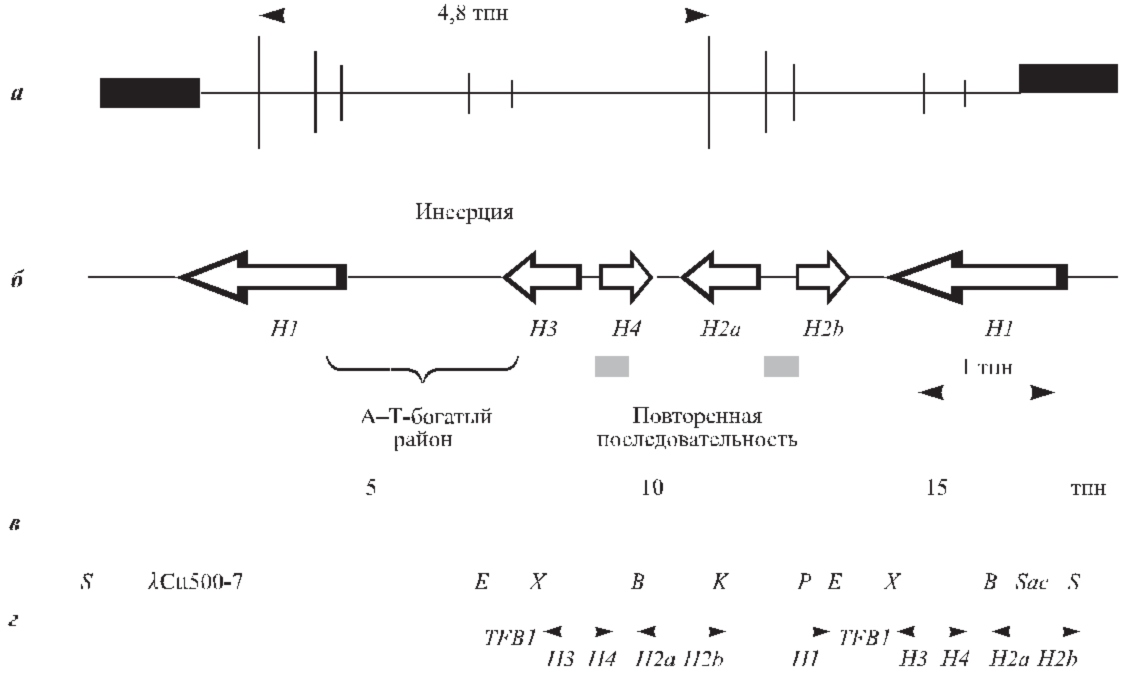


Схема организации генов, кодирующих гистоны в повторяющейся единице у *D. melanogaster* (*а–б*) и *Chironomus thummi* (*в–г*) [Lifton et al., 1978; Hankeln, Schmidt, 1990. — Из: Жимулёв, 1994. С. 124]: *а* — рестрикционная карта клона cDm500 (вертикальными линиями разной высоты обозначены слева направо сайты узнавания *Bgl*II, *Bam*HI, *Hin*dIII, *Hpa*I, *Sst*I); *б* — расположение генов (стрелками указано направление транскрипции); *в* — расстояния на карте; *г* — сайты рестрикции и локализация генов (*TFB1* — мобильный элемент)

нов не предотвращают активности остальных. Клоны генов 5S рРНК, выделенные из разных частей кластера, нормально транскрибируются в молекулы 5S рРНК в системе ооцита ксенопуса (*Xenopus*). Таким образом, эти гены не являются единицей транскрипции и функционируют независимо один от другого.

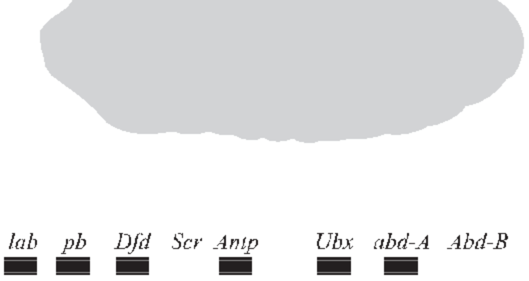
Общая длина кластера гистоновых генов у дрозофилы составляет примерно 500 тпн (100 повторов единицы около 5 тпн с пятью генами в каждой). Отдельные гены в пределах повторенной единицы транскрибируются в противоположных направлениях (т. е. с разных цепей ДНК), что свидетельствует о независимости их функционирования (рис. 7.76).

У другого вида насекомых — хирономуса (*Chironomus thummi*) эти же пять гистоновых генов составляют кластер длиной 6262 пн, однако и у этого вида гены, расположенные в кластере, могут считываться с разных цепей (см. рис. 7.76).

Иногда в кластеры объединяются и неповторенные гены. Семь генов, кодирующих белки теплового шока (см. разд. 13.10), располагаются во фрагменте ДНК длиной 12 тпн, картируемом с помощью гибридизации *in situ* в пуфе теплового шока 67B. Для генов этого района также характерна разная направленность транскрипции.

Гены, контролирующие развитие крупных частей тела (гомеозисные гены) дрозофилы, собраны в кластеры. Их называют комплексами. Головная капсула дрозофилы формируется в результате активности генов комплекса *Antennapedia* (*Antp-C*), брюшная часть — генами комплекса *Bithorax (BX-C)* (рис. 7.77).

Рисунок 7.77



Кластеры генов, контролирующих развитие головной (*lab–Antp*) и брюшной (*Ubx–Abd-B*) частей тела дрозофилы [Жимулёв, 1994. С. 141]

Литература к разделу 7.10

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 122–124.

Lewin B. Genes. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 726–728.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 400–408.

7.11. БИОТЕХНОЛОГИИ МАНИПУЛЯЦИЙ С ГЕНАМИ

С начала 1970-х гг., когда появилась первая публикация о получении *in vitro* рекомбинантной ДНК, возникла новая наука — генная инженерия. Ее основные направления — создание трансгенных животных и растений и разработка принципов генной терапии.

Для выполнения генно-инженерных работ необходимо решить следующие задачи:

1) конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных ДНК, пригодных для переноса в другие клетки;

2) разработка методов введения рекомбинантных ДНК в клетку;

3) создание условий для нормальной экспрессии генов, введенных в данную клетку.

Организмы, полученные в результате внедрения чужеродного генетического материала, называют трансгенными.

Чем принципиально генная инженерия отличается от классической селекции? В отличие от генных инженеров селекционеры при получении новых сортов растений, пород животных или рас микроорганизмов сталкиваются со следующими ограничениями:

1) нельзя скрещивать неродственные виды;

2) нельзя управлять процессом рекомбинации в организме;

3) нельзя предугадать, какое получится потомство.

Технологии, возникшие на основе методов молекулярной генетики, используются в самых разнообразных областях, таких как диагностика наследственных заболеваний у человека и животных, криминалистика и этнография, производство хозяйственно ценных и биологически активных веществ, получение штаммов микроорганизмов, трансгенных животных и растений с заданными свойствами, клонирование целых организмов, органов или отдельных клеток.

Некоторые из этих вопросов будут кратко рассмотрены ниже.

7.11.1. Стратегия генно-инженерных работ

Генно-инженерные работы выполняются в несколько этапов.

1. Получают нужный ген, готовый для последующих процедур трансгенеза. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома), синтезирован химически по имеющейся последовательности нуклеотидов, получен с помощью полимеразной цепной реакции или путем копирования ДНК на РНК-матрице с использованием обратной транскриптазы.

2. Подбирают вектор, обладающий всеми необходимыми характеристиками.

3. Вектор и клонируемый ген обрабатывают одинаковыми рестриктазами.

4. Сшивают вектор и встроенный ген с помощью ДНК-лигазы.

5. Вводят рекомбинантную конструкцию из вектора и встроенного гена в клетки-мишени реципиента — осуществляют трансформацию.

6. Проверяют наличие трансгена в клетках-мишенях. Для этого используют маркерные гены, которые находятся в молекуле-векторе наряду с трансгеном. Это гены, контролирующие устойчивость к антибиотикам или гербицидам. Поэтому на фоне соответствующих гербицидов или антибиотиков будут развиваться только те клетки, которые содержат гены устойчивости к ним, т. е. вектор со встроенным в него трансгеном.

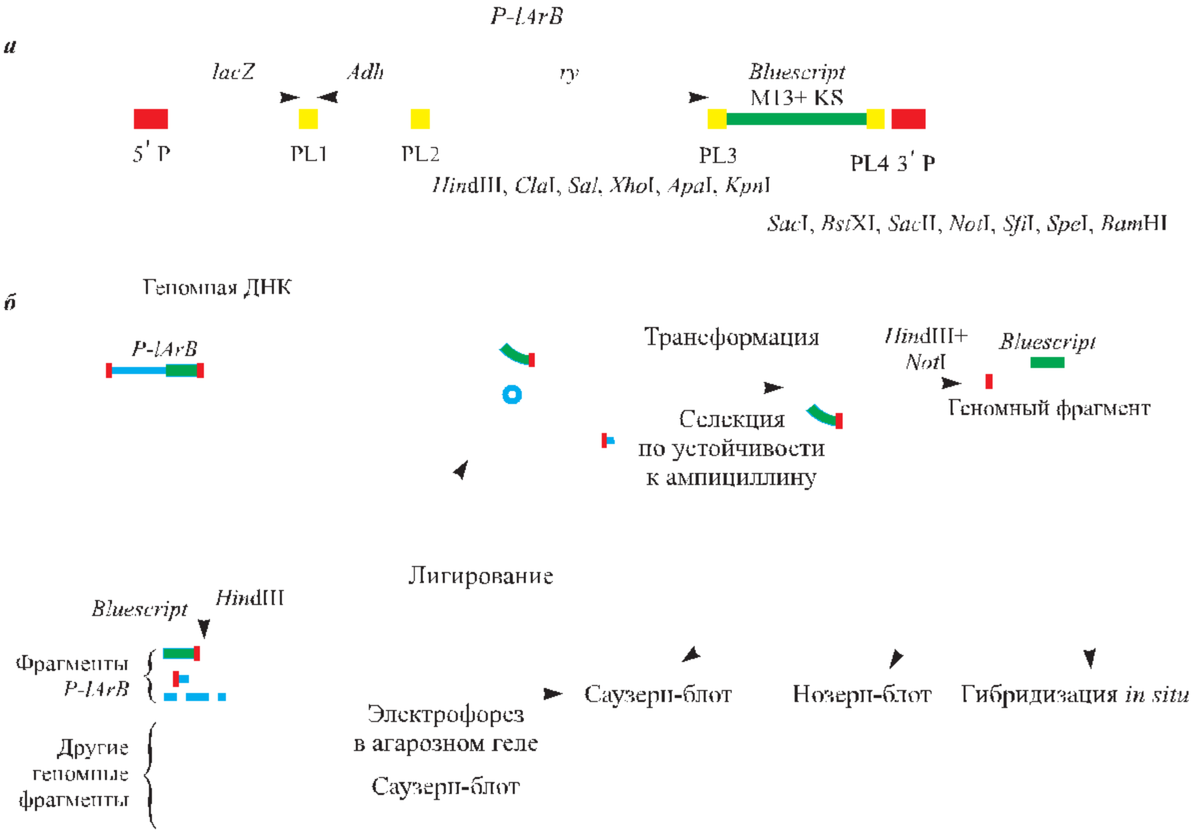
Рассмотрим подробнее некоторые из этих процедур.

7.11.1.1. Выделение ДНК нужного гена из генома

Эта часть работы является наиболее трудным этапом во всех процедурах генной инженерии, поскольку из многих тысяч генов, имеющихся в геноме, нужно выделить единственный конкретный ген, контролирующий развитие того или иного признака или кодирующий вполне определенный белок.

Точный и эффективный метод выделения определенных генов у дрозофилы (метод «спасения» плазмиды) разработан в лаборатории В. Геринга в 1989 г. В данном случае используется плазмида *p-lArB* (рис. 7.78, *а*). Она содержит концевые участки мобильного *P*-элемента, а также гены *lacZ* из *E. coli*, *Adh* и *ry*+

Рисунок 7.78



Структура плазмиды *P-lArB* (*а*) и метод «спасения» плазмиды (*б*) [Wilson et al., 1989]. Объяснения в тексте

из генома дрозофилы и плазмиду *Bluescript* (см. разд. 7.4.2.1). Эти гены отделены друг от друга полилинкерными участками (PL1–PL4), содержащими многие сайты рестрикции. Из них PL3 содержит шесть сайтов рестрикции, которые не встречаются в участках плазмиды ниже PL3. Сайт *Not*I является уникальным во всей конструкции. Сначала, используя *P*-элемент-помощник — источник транспозазы, мобилизуют перемещения *P-lArB*. Этот транспозон встраивается в различные гены, вызывая мутации. Таким образом, по мутантному фенотипу отбирают встройку в нужный ген. Затем ДНК из этой линии выделяют и разрезают, используя один из ферментов рестрикции, имеющих сайт узнавания в PL3, например *Hind*III. Образовавшиеся фрагменты лигируют (рис. 7.78, *б*). Получается большой набор фрагментов ДНК, которыми трансформируют компетентные клетки *E. coli*, помещенные на газон с ампициллином. Имеют шанс выжить только те кольцевые фрагменты, которые содержат плазмиду *Bluescript*, несущую ген устойчивости к ампициллину, и часть прилежащей геномной ДНК дрозофилы. В результате последующей совместной обработки данного кольца рестриктазами *Not*I и *Hind*III получаются два фрагмента: один содержит плазмиду *Bluescript*, второй — 3'-конец *P*-элемента и прилежащий участок генома дрозофилы. Эти фрагменты можно выделить и использовать в качестве зондов для Саузерн- и Нозерн-электрофорезов, а также для гибридизации *in situ*.

После того как фрагмент, прилежащий к месту встраивания, получен (а это, скорее всего, участок гена), можно, используя «хромосомную ходьбу», проклонировать протяженный участок генома.

В некоторых случаях для получения ДНК гена используют метод «хромосомных прыжков». Он позволяет обходить большие участки хромосомной ДНК, особенно районы, клонировать которые затруднительно (например, длинные тяжи повторов).

Можно попытаться получить ДНК гена из генома одного организма, используя гомологичный ген другого вида.

7.11.1.2. Перенос генов в клетки других организмов

Известны многочисленные методы, с помощью которых можно внедрить чужеродную ДНК в геном того или иного организма.

В качестве реципиентов, в геном которых встраиваются чужеродные гены, используют клетки культуры, эмбриональные клетки млекопитающих, некоторых растений, дрозофилы, пронуклеусы млекопитающих, у растений — протопласты, изолированные клетки и ткани, микроспоры, незрелые зиготические зародыши.

Микроинъекция. С помощью тонких стеклянных микропипеток (диаметром 0,1–0,5 мкм) и микроманипулятора можно ввести в ядро клетки млекопитающих векторную ДНК с включенным в нее трансгеном. Эффективность (частота интеграции трансгена в геном) такой трансформации достигает 50 %, т. е. в 50 из 100 инъецированных клеток происходит трансформация. Число молекул ДНК, вводимых за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000.

С помощью микроинъекций осуществляется трансформация у дрозофилы (см. разд. 7.4.10).

Для микроинъекций в клетки растений используются микроиглы с наружным диаметром 2 мкм. Трансформация растительных клеток происходит с эффективностью 10–20 % независимо от типа вектора.

Электропорация. Метод основан на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. На растительные протопласты (или животные клетки) и находящуюся в окружающей среде ДНК действуют высоковольтным импульсом (200–350 В, длительность 54 мс). Через образующиеся на короткое время поры ДНК проникает в клетку.

Трансфекция. Это встраивание чужеродной ДНК в культивируемые эукариотические клетки в результате обработки их изолированной ДНК. Эффективного поглощения ДНК удалось достичь при добавлении к ней ионов кальция. Предполагают, что клетки преимущественно поглощают частицы кальциевого преципитата ДНК по механизму фагоцитоза, а затем небольшая часть проникших в клетку молекул встраивается в хромосомную ДНК.

Упаковка в липосомы. Это один из методов, используемых для защиты трансформирующего генетического материала от разрушительного действия нуклеаз, присутствующих вне клеток. Липосомы — это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов и внутри которых располагается трансформирующая ДНК. Липосомы захватываются клетками, и ДНК попадает внутрь.

Бомбардирование микрочастицами. Это один из самых эффективных методов трансформации однодольных растений. В качестве исходного материала для трансформации берется суспензионная культура, каллусная ткань или 4–5-дневные культивируемые незрелые зародыши однодольных. Для бомбардирования используют частицы золота или вольфрама размером 0,6–3 мкм, на которые наносится

Рисунок 7.79

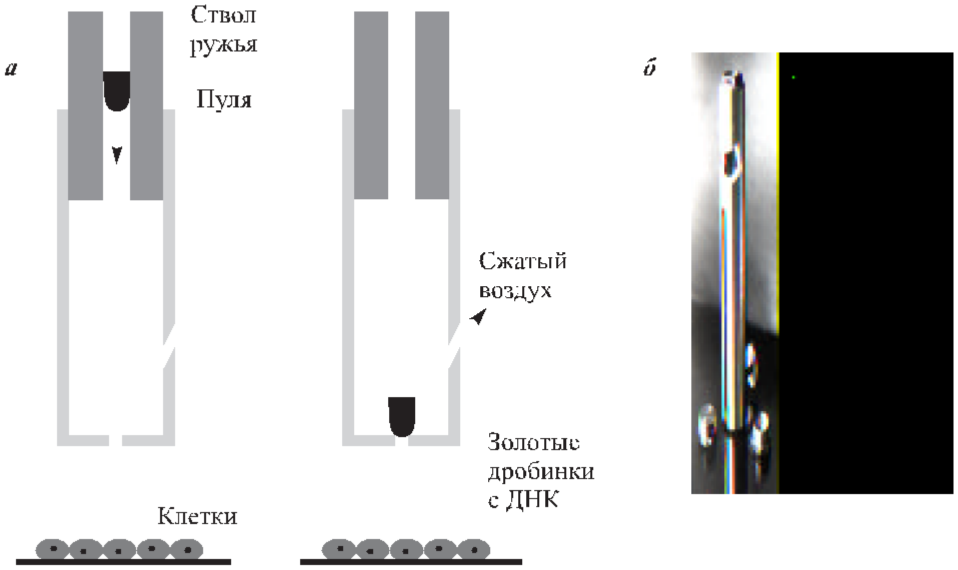


Схема действия (*а*) и внешний вид (*б*) «генной пушки» конструкции Р. К. Саляева

ДНК вектора, содержащего необходимый для трансформирования трансген. Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых частицы, содержащие гены, проникают в клетки и ядра. Клетки в направлении выстрела чаще всего гибнут, в то время как в зоне 0,6–1 см от центра находятся наиболее удачно трансформированные клетки. Частицы могут проникать на глубину 2–3 клеточных слоев.

Удивительную по простоте и дешевизне конструкцию «генной пушки» предложил Р. К. Саляев (рис. 7.79). По его замыслу металлические шарики, на которые нанесена ДНК, прикрепляются на фронтальную сторону тефлоновой пульки от духового ружья. На свободный конец ствола надевается специальная насадка. После выстрела пуля вылетает из ствола и застревает в отверстии насадки. Золотые (вольфрамовые) шарики с прикрепленной ДНК в силу инерции отрываются, летят в сторону клеточной суспензии, помещенной в 10–15 см от конца насадки, и прошивают клетки и ядра.

7.11.2. Задачи и достижения биотехнологии

7.11.2.1. Биотехнология растений

Генетически трансформированные растения впервые были получены в 1982 г. в работах П. Замбрыски с соавторами.

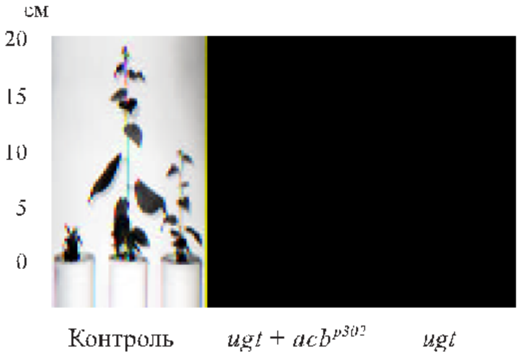
Основные направления в биотехнологии растений сводятся к тому, чтобы получать формы, устойчивые к гербицидам, патогенным грибам и вредным насекомым, с ускоренным ростом, с большей продолжительностью хранения плодов, улучшением их качества и увеличением количества. Приведем несколько примеров.

К настоящему времени клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени, что позволило получить трансгенные растения, устойчивые к таким гербицидам, как глифосат (Roundup), хлорсульфуроновые и имидазолиновые производные.

Изолированы также гены, кодирующие ферменты деградации некоторых гербицидов, что позволило получать трансгенные растения, устойчивые к фосфинотрицину, далапону и др. В 1997 г. сорт сои, устойчивый к Roundup, был признан в США сельскохозяйственным продуктом года.

Давно было известно, что бактерия *Bacillus thuringiensis* продуцирует белок, очень токсичный для многих насекомых, но безвредный для млекопитающих. Это прототоксин, расщепляющийся в кишечнике насекомых и превращающийся в активный токсин (дельта-токсин). Встраивание гена *bt*, кодирующего этот токсин, в геном растений позволяет получить растения, не поедаемые насекомыми.

Рисунок 7.80



Ускорение роста осины в результате совместного введения генов *ugt* и *acb* в ее геном.
Фотография любезно предоставлена Р. К. Саляевым и Н. И. Рекославской

С помощью подобных подходов в 1993 г. в США были получены сорта хлопка и кукурузы, а также картофель, устойчивый к колорадскому жуку.

На рис. 7.80 показаны трансгенные растения осины, которым ввели гены *ugt* из кукурузы и acb^{p302} из арабидопсиса, влияющие на скорость роста.

К настоящему времени показано, что растения могут производить белки животного происхождения. Встраивание в геном арабидопсиса химерного гена, состоящего из части гена запасного 2S-белка арабидопсиса и кодирующей части для нейропептида — энкефалина, приводило к синтезу химерного белка в количестве до 200 нг на 1 г семян. Два структурных белковых домена были связаны последовательностью, узнаваемой трипсином, что давало возможность в дальнейшем легко изолировать чистый энкефалин. Такие примеры многочисленны.

В 1995 г. в США была закончена экспериментальная проверка и получено разрешение федеральных властей на выращивание и коммерческое использование трансгенных растений рапса с измененным составом растительного масла, включающего вместе с обычными 16- и 18-членными жирными кислотами также до 45 % 12-членной жирной кислоты — лауриновой, необходимой для производства стиральных порошков, шампуней, косметики.

Проводятся многочисленные исследования по получению трансгенных растений, накапливающих целлюлозу, крахмал. Выработаны подходы к манипулированию генами, влияющими

на синтез фитогормонов, скорость роста, устойчивость к вредителям, таким как грибы, бактерии, нематоды, вирусы, а также к абиотическим факторам (засуха, засоленность). Растения становятся продуцентами вакцин, фармакологических белков и антител. Получены и испытываются трансгенные растения хлопка с уже окрашенным волокном.

Вообще в мире применение трансгенных растений стремительно расширяется: в 1996 г. в США они занимали площадь 3 млн акров (1 акр = 0,404 га), в 1997 — 13–15 млн акров, в 1998 г. — не менее 60 млн акров [Глеба, 1998].

7.11.2.2. Трансгенные животные

В 1980 г. группой Дж. Гордона было показано, что гены, инъецированные в пронуклеус оплодотворенного яйца мыши, встраиваются в хромосомы и присутствуют во всех клетках новорожденного мышонка. С этой работы началась эра получения трансгенных животных. Уже в 1985 г. ряд генов был перенесен сельскохозяйственным животным (кроликам, свиньям и овцам). Трансгенные млекопитающие, с одной стороны, являются лучшей моделью для изучения болезней человека, с другой — успешно используются для производства необходимых человеку биомедицинских препаратов, в частности белков.

В настоящее время исследователи сосредоточились на решении следующих вопросов:

1. Изучение возможности замены у данного вида не столько генов, сколько целых кусков хромосом, используя уже имеющиеся библиотеки на основе YAC.
2. В онкологии одним из направлений является замена онкогенов, т. е. генов, мутантная экспрессия которых приводит к возникновению рака.
3. Инсерция генов ростовых гормонов. Показано, что трансгенные особи крупного рогатого скота, имеющие дополнительный ген ростового гормона, значительно быстрее растут.
4. Перенос генов в клетки животных, из которых будут формироваться донорские органы для человека.

7.11.2.3. Биотехнология микроорганизмов

Несмотря на то что человечество занимается биотехнологией микроорганизмов, осознанно или нет, уже много веков, современная мощная технология, связанная с переносом генов, возникла не так давно — примерно с середины 70-х гг. Началом промышленной генной инженерии принято считать 1980 г., когда в США был выдан первый патент на генно-инженерный штамм микроорганизма, способного разлагать нефть.

В результате использования генно-инженерных методов изменилось содержание современной промышленной микробиологии в следующих аспектах:

1. Существенно повысилась продуктивность микроорганизмов путем введения дополнительных генов, увеличения их числа или активности.
2. В результате введения в микробную клетку новых генов удалось изменить питательные потребности микроорганизмов, т. е. стало возможно выращивать их на другой среде.
3. Микроорганизмы стали синтезировать несвойственные им вещества. Некоторые белки человека, синтезированные в клетках микроорганизмов, в том числе инсулин, интерфероны, интерлейкины, находят терапевтическое применение.

Плоды успехов в области биотехнологии пожинают в основном США, на долю которых приходится около 63 % производства всех биотехнологических медицинских препаратов, в странах Западной Европы — 25 %, в Японии — 7 %.

7.11.2.4. Генная терапия

Первая успешная попытка применить генотерапию в клинической практике была предпринята в 1990 г. в США. Ребенку, страдающему тяжелым комбинированным иммунодефицитом, связанным с дефектом гена, кодирующего аденозиндезаминазу, была введена неповрежденная копия гена. Извлеченные у больного клетки (Т-лимфоциты крови) культивировали в пробирке, при помощи ретровирусного вектора вводили неповрежденный ген аденозиндезаминазы и возвращали клетки больному.

Другая группа болезней, для которой существуют хорошие перспективы излечения генно-инженерными методами, — лизосомные болезни накопления.

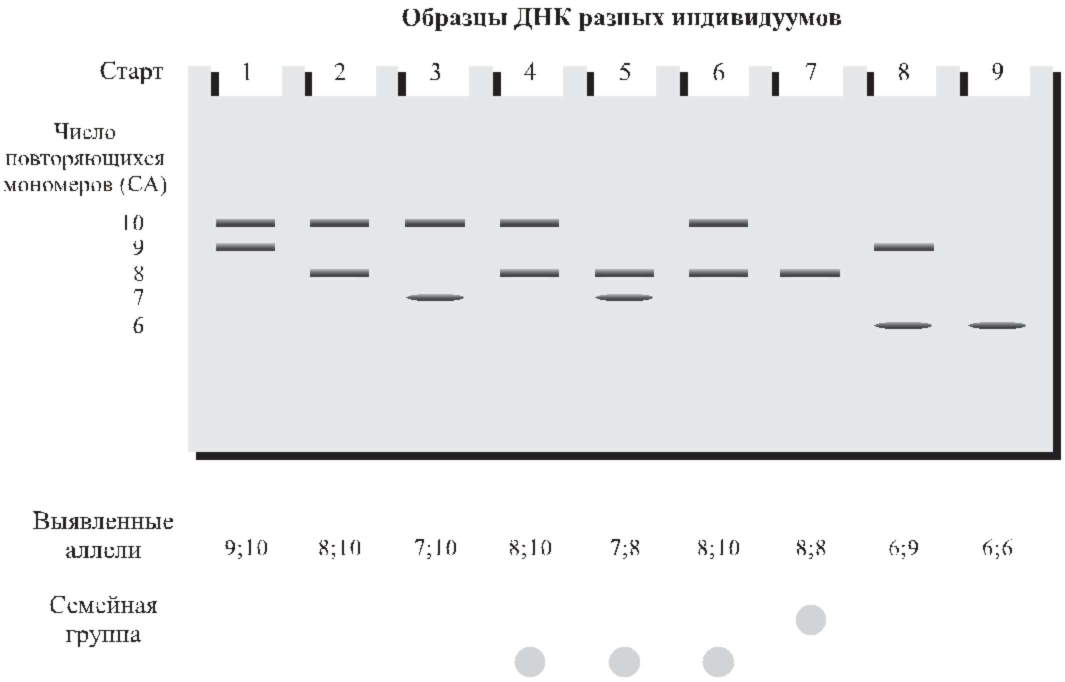
На сегодняшний день поддаются излечению с помощью трансгенеза уже около 10 болезней человека.

К числу важных практических достижений генной инженерии следует также отнести создание диагностических препаратов. На сегодняшний день в медицинскую практику введено более 200 новых диагностикумов.

7.11.2.5. Применение в криминалистике

Для идентификации личности или установления родства используют метод полимеразной цепной реакции (см. разд. 7.4.8). Связано это с тем, что в таких случаях для анализа бывают

Рисунок 7.81



Анализ аллельного состояния локуса *THO1* [Янковский, 1999].
Внизу представлена семейная группа, выявленная в результате анализа аллельного состояния полиморфных локусов

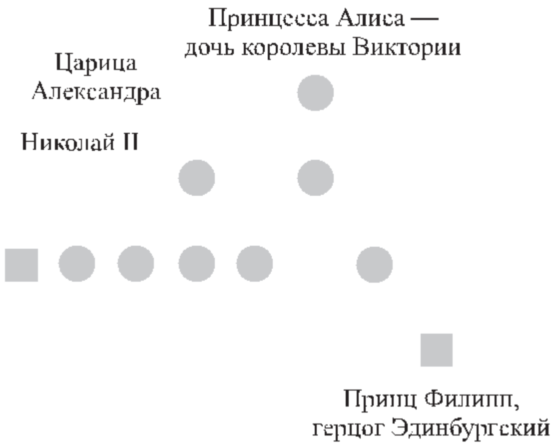
доступными лишь незначительные количества ДНК, часто всего несколько пикограммов.

Удобным для анализа является наличие аллелей по конкретному гену, различающихся длиной ДНК. Например, ген амелогенина имеет два аллельных состояния, причем тот аллель, который локализован в *Y*-хромосоме, на 6 пн длиннее того, что в *X*-хромосоме. Эти различия легко выявить при электрофорезе и таким образом определить пол носителя данного образца ДНК (см. рис. 7.27).

Для установления степени генетического родства используют гены, имеющие множественные аллели, при этом ДНК каждого аллеля отличается по длине от других. Например, ген *TH01* у человека содержит многократно повторяющуюся последовательность динуклеотидов — короткий тандемный повтор цитозин–аденин. Существуют пять аллелей гена, содержащих от 5 до 10 копий этого динуклеотида: $(CA)_5$, $(CA)_6$, $(CA)_7$…..$(CA)_{10}$. Они легко различаются по длине ПЦР-фрагментов, выявляемых в геле после электрофореза (рис. 7.81). На фореграммах обычно видно по две фракции у гетерозигот и по одной у гомозигот. У ребенка один фрагмент по размеру совпадает с одним из фрагментов матери, а второй — с одним из фрагментов отца. Если у двух индивидов не выявляются одинаковые полосы, то их родство по вертикали исключено, а если одинаковые полосы присутствуют, то родство возможно. Например, по данным анализа, представленным на рис. 7.81, мы видим, что индивид 3 (его принадлежность к мужскому полу была установлена раньше в независимом исследовании) несет аллели $(CA)_7$ и $(CA)_{10}$ и что эти аллели отсутствуют у индивидов 7, 8 и 9. Следовательно, индивид 3 не может быть их отцом или сыном, так как у детей должен присутствовать какой-либо из аллелей родителя. В то же время индивид 3 может быть либо отцом, либо сыном индивидов 1, 2, 4, 5 или 6. Аналогичным образом можно проанализировать семейные отношения индивидов-женщин и в итоге выстроить схему возможных родственных связей в данной группе (см. рис. 7.81).

Для анализа семейных отношений часто используют молекулярные маркеры в митохондриальной ДНК. Дело в том, что при оплодотворении цитоплазма сперматозоида, содержащая митохондрии, не попадает внутрь яйцеклетки. Зигота получает митохондрии только из клеток матери. Последовательность нуклеотидов митохондриальной ДНК идентична у лиц, восходящих к общему предку по материнской линии.

Рисунок 7.82



Материнская генеалогическая ветвь императрицы Александры Федоровны [Янковский, 1999]. Линии родственников, имеющих одинаковые последовательности митохондриальной ДНК, выделены серым цветом

В ходе расследования возможной принадлежности останков, найденных в екатеринбургском захоронении, членам семьи царя Николая II изучали последовательность нуклеотидов в вариабельном участке мтДНК (в так называемой Д-петле), предварительно выделенной из костных останков и размноженной с помощью ПЦР. После того как последовательности ДНК были определены, их сравнили с последовательностями, выявляемыми в ДНК ныне живущего принца Филиппа, герцога Эдинбургского (рис. 7.82). Оказалось, что последовательности нуклеотидов в мтДНК у принца Филиппа и в костных останках № 4–7 в вариабельном участке идентичны, что полностью согласуется с родословной.

Литература к разделу 7.11

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 411–426.

Глеба Ю. Ю. Биотехнология растений // Соросовский образовательный журн. 1998. № 6. С. 3–8.

Зеленин А. В. Генная терапия: этические аспекты и проблемы генетической безопасности // Генетика. 1999. Т. 35. С. 1605–1612.

Лещинская И. Б. Генетическая инженерия // Соросовский образовательный журн. 1996. № 1. С. 32–39.

Лещинская И. Б. Современная промышленная микробиология // Там же. 2000. Т. 6, № 4. С. 14–18.

Лутова Л. А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // Там же. 2000. Т. 6, № 10. С. 10–17.

Лутова Л. А. и др. Генетика развития растений. СПб.: Наука, 2000. С. 395–436.

Першина Л. А. Методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений. Ч. 2. Новосибирск: Изд. НГУ, 2000. 69 с.

Свердлов Е. Д. Очерки современной молекулярной генетики // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1995. № 2. С. 3–15. № 3. С 3–17. № 4. С. 3–19.

Фаворова О. О. Лечение генами — фантастика или реальность? // Соросовский образовательный журн. 1997. № 2. С. 21–27.

Янковский Н. К. Молекулярная генетика и судебная медицина // Современное естествознание: Энциклопедия. Т. 2. Общая биология. М.: Наука-Флинта, 1999. С. 143–149.

Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В. С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 1998. 416 с.

Чайлахян Л. М., Вепринцев Б. Н., Свиридова Т. А., Никитин В. А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии // Биофизика. 1987. Т. 32, вып. 5. С. 874–887.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 287–301.

Antonarakis S. E., Scott H. S. The human genome project and its impact in medicine // Europ. Rev. 1996. Vol. 4, № 4. P. 415–426.

Birnstiel M. L. Gene therapy // Ibid. P. 335–356.

Birnstiel M. L. The genetic revolution 1950–1996: an introduction // Ibid. P. 333–334.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 633–656.

Murray N. E. Gene cloning // Europ. Rev. 1996. Vol. 4, № 4. P. 357–370.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 479–493.

Sibilia M., Wagner E. F. Transgenic animals // Europ. Rev. 1996. Vol. 4, № 4. P. 371–391.

Strachan T., Read A. P. Human Molecular Genetics. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, 1996. P. 96–106.

Walden R., Maas C., Martini N., Schell J. Transgenic plants // Europ. Rev. 1996. Vol. 4, № 4. P. 393–414.

Wilson C., Pirson R. K., Bellen H. J. et al. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila* // Genes & Development. 1989. Vol. 3. P. 1301–1313.

Zambryski P. et al. Ti-plasmid vector for introduction of DNA into plant cell without alteration of their normal regeneration capacity // EMBO J. 1983. Vol. 2. P. 2143–2150.

Глава 8
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕНЕЗА, РЕПАРАЦИИ ДНК, КРОССИНГОВЕРА И ГЕННОЙ КОНВЕРСИИ

8.1. ХАРАКТЕРИСТИКИ МУТАЦИЙ

8.1.1. Мутации, связанные с нарушением генетического кода

Мутации представляют собой решающее доказательство того, что ДНК является материалом наследственности. Когда изменение последовательности нуклеотидов ДНК обусловливает изменение в последовательности аминокислот белка, можно заключить, что ДНК кодирует этот белок.

Различают два основных типа точковых мутаций: а) замена оснований и б) мутации со сдвигом рамки считывания, связанные с выпадением или вставкой одного или нескольких оснований.

Замены оснований чаще происходят путем замены одного пурина на другой, либо одного пиримидина на другой. Эти замены называют транзициями. Возможны четыре типа транзиций: A → G, G → A, T → C, C → T. В результате G–C-пара заменяется на A–T-пару или наоборот.

Классическим примером транзиций являются замены нуклеотидов под действием азотистой кислоты. Этот реагент производит окислительное дезаминирование, что превращает цитозин в урацил. В следующем после транзиции цикле репликации ДНК этот урацил спаривается с аденином вместо гуанина, с которым должен был спариваться исходный цитозин. В результате пара C–G заменяется на T–A, когда уже аденин спаривается с тимином в следующем цикле репликации. Азотистая кислота также дезаминирует аденин, обусловливая обратную транзицию из A–T в G–C-пару.

Транзиции могут быть также вызваны нарушением спаривания оснований, когда спариваются необычные партнеры. Некоторые мутагены представляют собой аналоги нормальных оснований. Мутагенное действие этих соединений является результатом их включения в ДНК на место одного из регулярных оснований. Например, бромурацил (BrdU) — аналог тимина — содержит атом брома на месте метильной группы. BrdU включается в ДНК на место тимина и может спариваться уже не с аденином, а с гуанином, что приводит к замене исходной A–T-пары на G–C.

Мутации типа транзиций индуцируются с определенной долей вероятности в каждом репликационном цикле.

Более редкими являются замены пурина на пиримидин или пиримидина на пурин. Такие замены, называемые трансверсиями, могут быть восьми типов: A → T, T → A, A → C, C → A, G → C, C → G, G → T, T → G. В результате этого пара A–T превращается в T–A или C–G.

Мутации, возникшие путем замены оснований, часто проявляют некоторые остаточные функции нормального гена, т. е. говорят, что мутация как бы «подтекает» (leaky-мутации). Эта ситуация возникает, когда изменение последовательности аминокислот в соответствующем белке не полностью устраняет его активность.

Мутации по типу замены оснований приводят к появлению двух сортов мутантных кодонов в мРНК — с измененным смыслом (миссенс) и бессмысленных (нонсенс). Результатом миссенс-мутации, ведущей к изменению кодирующих триплетов, может быть замена одной аминокислоты в полипептиде на другую. Однако, поскольку код имеет вырожденный характер, не всякая мутация в кодоне приводит к замене аминокислоты. Так, при замене пары оснований вместо одного кодона может возникнуть другой, кодирующий ту же аминокислоту. Белок в данном случае сохраняет функции белка дикого типа. Такие мутации называют молчащими. Кроме того, не всякая замена аминокислоты отразится на функциональной активности белка. Кодон, образовавшийся в результате мутации, может кодировать другую аминокислоту, но с химически эквивалентными функциями. Например, вместо лизина в молекуле белка стал аргинин. Свойства белка при

этом могут не измениться. Это нейтральные мутации. Следовательно, в обоих случаях мутация останется невыявленной. Это объясняет, почему частота мутаций в данном гене и встречаемость мутантов по нему могут не совпадать.

Примером миссенс-мутаций может быть замена нуклеотида в шестом кодоне β-цепи гемоглобина у человека. У А-формы ($Hb^A\beta$) этот кодон (GAPu) кодирует отрицательно заряженную глутаминовую кислоту. В результате замены А на Т в кодирующей цепи в молекуле белка шестой аминокислотой с NH_2-конца становится нейтральный валин и образуется S-форма гемоглобина. Лица, гомозиготные по мутантному аллелю, кодирующему синтез аномальной S-β-формы, страдают тяжелой формой гемолитической анемии, называемой серповидно-клеточной анемией. В условиях недостатка кислорода гемоглобин S образует кристаллоподобные скопления, нарушающие морфологию эритроцитов, которые удлиняются, принимая серповидную форму. Такие аномальные клетки могут закупорить мелкие сосуды и прекратить тем самым доступ кислорода к различным тканям.

К типу «нонсенс» относят мутации, приводящие к заменам пар оснований, при которых кодоны, определяющие какие-либо аминокислоты, превращаются в нонсенс-кодоны, останавливающие трансляцию. Появление такого кодона не в конце структурного гена, а внутри него приводит к преждевременной терминации трансляции, т. е. к формированию укороченной полипептидной цепи. Подобная терминация, как правило, сопровождается полным выключением функции белка.

Мутации со сдвигом рамки считывания кодонов (frame shift), обусловленные вставками или выпадениями одного или нескольких нуклеотидов, напоминают нонсенс-мутации.

Очень часто ниже вставки или делеции возникает новая рамка считывания, в результате чего к уже синтезированной части полипептида добавляется новый набор аминокислот, которые данным геном не кодируются. Возможна ситуация, когда из-за сдвига рамки нарушаются и прочитываются существовавшие в нормальном гене стоп-кодоны и синтезируется более длинный полипептид. В любом случае в итоге получается нефункциональный белок. Вторичная мутация может восстановить структуру нормального белка. Вот как остроумно проиллюстрировал это С. М. Гершензон [1983. С. 287–289]:

«Для наглядности структуру белка можно изобразить последовательным рядом слов, состоящих из трех букв каждое, из которых образована какая-нибудь фраза, условно представляющая информацию, записанную в данном отрезке ДНК, например:

вот лес вяз дуб бук ивы тут был пал дым шел три дня

Допустим, что первичная мутация заключалась во вставке лишнего нуклеотида (т. е. какой-нибудь буквы) между вторым и третьим триплетом (словом) фразы:

Вставка
↓
вот лес а вяз дуб бук ивы тут был пал дым шел три дня

После возникновения такой вставки получим:

вот лес авя зду ббу кив ыту тбы лпа лды мше лтр идн я

За исключением первых двух триплетов (слов) все остальные оказываются замененными совсем другими, т. е. последовательность чередования аминокислот в белке, кодируемом данным геном, будет совершенно иной, чем до возникновения мутации, и ген утратит свою нормальную функцию.

Пусть теперь в этом отрезке возникнет вторичная мутация, заключающаяся в выпадении какого-нибудь нуклеотида (т. е. буквы) поблизости от точки первичной мутации, например, в четвертом триплете („зду“) будет утеряна буква „з“:

Выпадение
↓
вот лес авя зду ббу кив ыту тбы лпа лды мше лтр идн я

При прочтении триплетами получается:

вот лес авя дуб бук ивы тут был пал дым шел три дня

Смысл информации, заключенной во фразе, восстановлен почти полностью — утеряно значение только одного слова („вяз“). Последовательность аминокислот в молекуле белка, кодируемого геном, станет почти нормальной — изменится лишь единственная аминокислота (третья слева) среди множества, из которых эта молекула построена. В большинстве случаев это не отразится или лишь незначительно отразится на биологических свойствах данного белка, т. е. ген будет функционировать нормально или почти нормально.

Рассуждая аналогичным образом, можно объяснить подавление проявления и такой первичной мутации, при которой произошла не вставка, а выпадение нуклеотида из ДНК. Толь-

ко тут придется допустить, что вторичная мутация, возникшая вблизи первичной, заключалась не в выпадении, а во вставке нуклеотида. Проиллюстрировать это можно той же фразой.

Первичная мутация (выпадение буквы „з“ в третьем триплете):

Выпадение
↓
вот лес вяз дуб бук ивы тут был пал дым шел три дня

При прочтении триплетами смысл фразы теряется:

вот лес вяд убб уки выт утб ылп алд ымш елт рид ня

Вторичная мутация (вставка буквы „а“ между вторым и третьим триплетом):

Вставка
↓
вот лес а вяд убб уки выт утб ылп алд ымш елт рид ня

При прочтении триплетами получается:

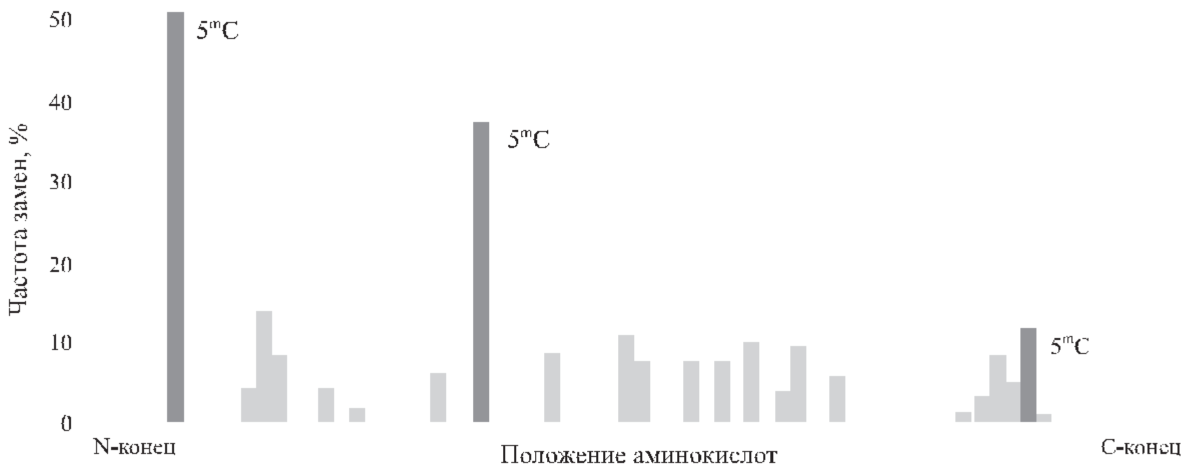
вот лес авя дуб бук ивы тут был пал дым шел три дня

Смысл информации восстановлен почти полностью. Как и в предыдущем примере, утеряно значение только одного слова. Ген будет функционировать нормально или почти нормально».

Миссенс-мутации, например в генах лактозного оперона *E. coli*, будут инактивировать только те гены, в которых они произошли, не влияя на активность соседних генов. Иной оказалась ситуация с нонсенс-мутациями. Если такая мутация возникает в гене *lacZ*, это приводит к потере функции не только самого гена *lacZ*, но и обоих генов (*lacY, lacA*), расположенных ниже. При возникновении нонсенс-мутации в гене *lacY* выключается также и ген *lacA*, но ген *lacZ* функционирует нормально. И наконец, нонсенс-мутация гена *lacA* затрагивает функционирование только этого гена. Таким образом, нонсенс-мутации в разных частях лактозного оперона имеют разный эффект, т. е. они проявляют полярное действие. Нонсенс-мутации, обнаруживающие полярный эффект, называют полярными мутациями.

Мутации очень часто концентрируются в «горячих» точках. Если рассматривать мутации с точки зрения инактивации гена, большинство генов у данного вида обнаруживает более или менее одинаковую скорость мутирования на единицу длины ДНК. Это предполагает, что ген является мишенью для мутагенов и что повреждение любой части гена может изменить его функционирование. В результате вероятность мутирования в целом коррелирует с размером гена. Однако возникает вопрос: все ли пары оснований одинаково чувствительны к воздействию мутагенов? Чтобы на него ответить, обычно подбирают большую коллекцию мутаций одного и того же гена, затем определяют локализацию каждой мутации. Большинство из них расположено в различных участках гена, но некоторые сайты повторяются. В результате в некоторых сайтах расположены не одна, а две, три и даже 10 и 100 му-

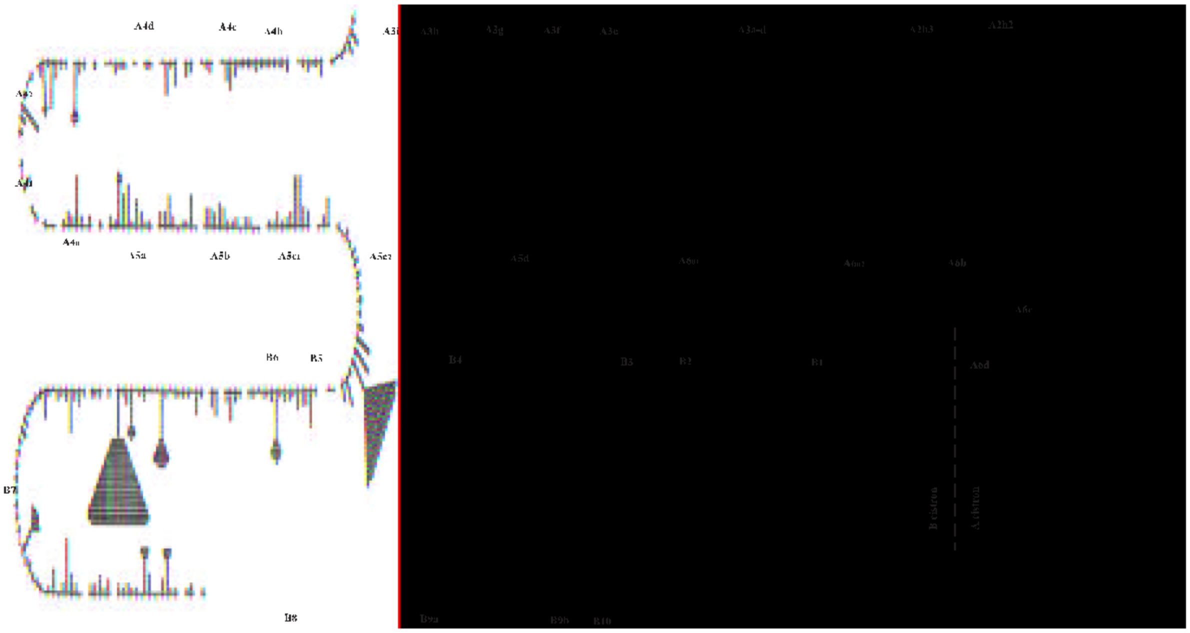
Рисунок 8.1



Распределение частот спонтанных транзиций G–C → A–T и образование стоп-кодонов в различных участках гена-репрессора *lac* у *E.coli* [Russell, 1998. P. 629].

Очевидно образование «горячих» точек в местах локализации 5-метилцитозина (5^{m}C)

Рисунок 8.2



Распределение спонтанных мутаций в части района *rII* фага T4. Каждый квадратик представляет собой одну мутацию в данном локусе [Benzer, 1961]

таций. Такие участки гена называются «горячими» точками мутирования (hotspots). Они не универсальны для всех типов мутаций. Различные мутагены имеют различные «горячие» точки (рис. 8.1).

На рис. 8.2 показано распределение частот возникновения спонтанных мутаций в локусе *rII* фага T4.

Литература к разделу 8.1.1

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 153–157.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 358–362.

Benzer S. On the topography of the genetic fine structure // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1961. Vol. 47. P. 403–415.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 101–107.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 616–637.

8.1.2. Мутации, индуцируемые инсерциями мобильных элементов

Долгое время точковые мутации внутри гена, вроде транзиций и трансверсий, рассматривались как основной тип изменений индивидуальных генов. Однако мы теперь знаем, что весьма частыми могут быть инсерции мобильных элементов генома. В результате инсерции гены, как правило, более не дают нормального фенотипа. Если мобильный элемент вырезается из места встройки, могут возникнуть делеции прилегающего материала.

Значительное различие между точковыми мутациями и инсерциями или перемещениями мобильных элементов заключается в том, что частота точковых мутаций может увеличиваться посредством обработки мутагенами, в то время как результаты перемещений мобильных элементов не зависят от мутагенов.

Литература к разделу 8.1.2

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 102.

8.1.3. Мутации, обусловленные экспансией тринуклеотидных повторов

В 1991 г. А. Феркерк и его коллеги идентифицировали ген *FMR-1* (fragile X mental retardation 1), расположенный в хрупком (fragile) сайте между бэндами q27 и q28 в *X*-хромосоме человека. Ген экспрессируется в клетках мозга. У мутантов-гемизигот развивается умеренная степень умственной отсталости (I.Q. ~50). На долю мутантов по этому гену приходится примерно четверть всех психических заболеваний у мужчин. С гена считывается мРНК размером 4,8 тпн, кодирующая белок, состоящий

Рисунок 8.3

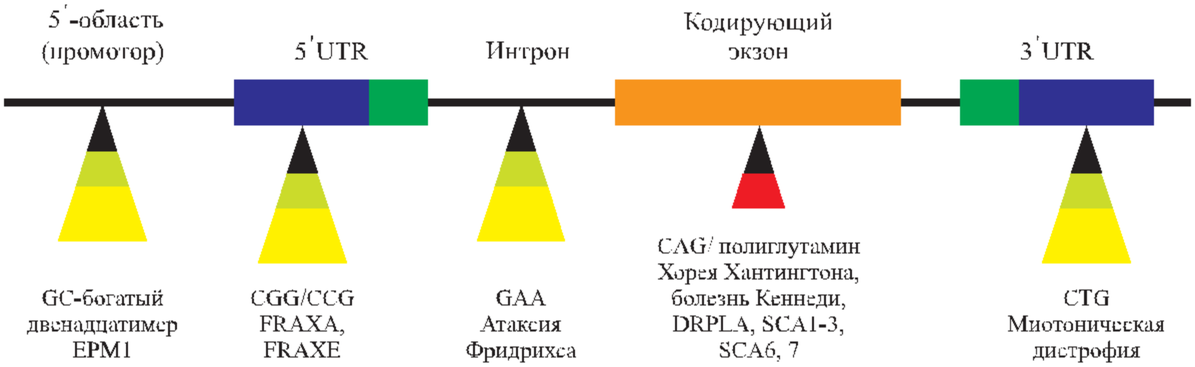


Схема локализации внутригенных повторов и определяемые ими болезни у человека [Mandel, 1997. P. 768].

UTR — нетранслируемые районы гена. Треугольниками показана относительная степень повторяемости тринуклеотидов: черные районы — число повторов в нормальном гене, зеленые — экспансия (увеличение числа копий тандемных повторов), соответствующая нестабильной предмутации, красные и желтые — еще большая степень экспансии, которая ведет к болезни. Внизу указаны типы тринуклеотидов и названия болезней: EPM1 — прогрессирующая миоклональная эпилепсия; FRAXA — синдром умственной отсталости, связанный с хрупким (fragile) сайтом в *X*-хромосоме; FRAXE — умеренная умственная отсталость; спинобульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди); DRPLA — дентаторубропаллидолузианская атрофия; SCA1-3, 6 — спиноцеребральная атаксия; SCA7 — спиноцеребральная атаксия с макулярной дегенерацией

из 657 аминокислотных остатков. Выше кодирующего района расположен сегмент, в котором триплет CGG повторен примерно 30 раз (рис. 8.3). У некоторых особей число копий триплета увеличено до 50–100. У них возникает цитологически выявляемый хрупкий сайт в *X*-хромосоме. Мужчины — носители этого X^F-аллеля обнаруживают нормальное умственное развитие, но они становятся «переносчиками». В F_1 дочери, получившие этот аллель, также имеют нормальный I.Q. Однако в этой хромосоме начинается экспансия CGG-повтора, когда она передается следующему поколению. Поскольку экспансия происходит в раннем эмбриогенезе, потомки F_2 будут мозаичными. В клетках зародышевого пути ген имеет 50–200 копий повтора, хотя в других клетках их может быть уже несколько тысяч. В последнем случае белок, кодируемый геном *FMR-1*, естественно, не функционирует, и нормальный уровень умственного развития не достигается.

Не менее чем в 50 генах в геноме человека содержится по пять или более повторенных триплетов. И по крайней мере 12 болезней у человека обусловлены экспансией, т. е. увеличением числа копий, тринуклеотидных повторов (см. рис. 8.3).

Можно вывести некоторые характеристики этого типа мутирования.

1. Нестабильность числа копий тринуклеотидных повторов начинается после достижения определенного порога (35–50 копий), после чего число тринуклеотидов начинает быстро увеличиваться в последующих поколениях.

2. Все известные до сих пор мутации этого сорта подразделяются на две группы (см. рис. 8.3). В первую входят мутации, обусловленные массивной экспансией в некодирующих районах. Вторая группа включает мутации с умеренной экспансией CAG-повторов, кодирующих полиглутамин, что может привести к трансляции токсического белка с последующей гибелью нейронов.

Литература к разделу 8.1.3

Morell V. The puzzle of the triple repeats // Science. 1993. Vol. 260. P. 1422–1423.

Mandel J.-L. Breaking the rule of three // Nature. 1997. Vol. 386. P. 767–769.

8.1.4. Обратные и супрессорные мутации

Мутации гена дикого типа, приводящие к изменению признака, т. е. к мутантному фенотипу, называют прямыми. Многие прямые мутации способны ревертировать. Это означает, что какая-то другая мутация восстанавливает дикий фенотип мутанта, изменяемый в резуль-

Рисунок 8.4

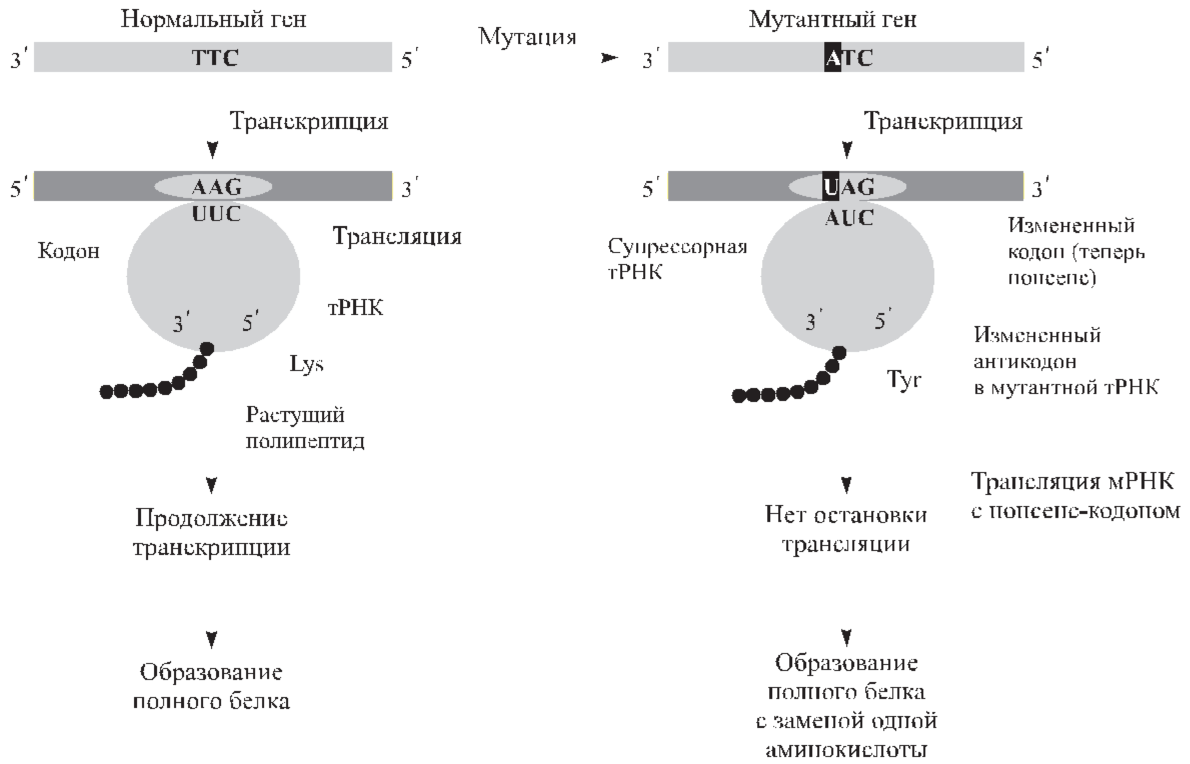


Схема действия внегенной нонсенс-супрессорной мутации, связанной с мутацией в гене тРНК [Russell, 1998. P. 623].

Ген тирозиновой тРНК мутировал таким образом, что антикодон тРНК изменился с 3'-UUC-5' на 3'-AUC-5', который может прочитать нонсенс-кодон UAG, встраивая комплементарно тирозин в полипептидную цепь

тате первой мутации. Такие мутации называют обратными или реверсиями. Возможность получения ревертантов является важной характеристикой, которая отличает точковые мутации и инсерции от делеций, поскольку:

1) точковая мутация может ревертировать с восстановлением исходной последовательности нуклеотидов или с образованием компенсаторной мутации в какой-то другой части гена;

2) инсерция дополнительного материала может ревертировать в результате делеции инсертированного материала;

3) делеция части гена не может ревертировать.

Возврат к дикому фенотипу может произойти за счет истинной обратной мутации в том же сайте гена, что и прямая мутация. Это приводит к восстановлению исходной нуклеотидной последовательности. Другая возможность образования реверсий состоит в том, что вторая мутация локализуется в другом месте генома и каким-то образом компенсирует дефект, обусловленный первой мутацией. Мутации такого типа называют супрессорными, поскольку они супрессируют (подавляют) действие исходных мутаций.

Для того чтобы отличить истинные обратные мутации от супрессорных, используют метод анализирующих скрещиваний, при которых ревертантов скрещивают с особями, имеющими исходный дикий фенотип. Если образование ревертанта связано с истинной обратной мутацией, все потомство от такого скрещивания должно иметь дикий фенотип. Если же анализируемый организм несет две мутации — прямую и супрессорную, то в результате рекомбинации возникает потомство дикого либо мутантного фенотипа. Частота возникновения последнего зависит от того, насколько сцеплены прямая и супрессорная мутации. В случае тесного сцепления вероятность образования рекомбинантного потомства с мутантным фенотипом снижается. Вместе с тем потомство, несущее только супрессорную мутацию, может иметь дикий фенотип по признаку, контролируемому исходной мутацией, но мутантный по другому признаку, контролируемому самой супрессорной мутацией.

Частота истинных обратных мутаций существенно ниже частоты прямых мутаций, поскольку последние могут возникнуть в различных сайтах данного гена. Большинство обратных мутаций (реверсий) — супрессорные. Супрессия может быть двух сортов: внутригенная и внегенная. Внутригенная супрессия мутаций с заменой основания была продемонстрирована в 1967 г. Ч. Яновским, показавшим, что активность мутантного фермента триптофансинтетазы у *E.coli* восстанавливается, если в том же измененном триплете возникает вторая мутация, в результате которой в полипептид, кодируемый мутантным геном, включается более подходящая аминокислота. Так, замена в положении 210 глицина (CGA) на аргинин (AGA) в результате миссенс-мутации инактивирует фермент. Вторая мутация, вызывающая замену кодона AGA на AGU (или AGC), приведет к включению в белок серина вместо аргинина, что, хотя и не будет истинной реверсией, приведет к восстановлению каталитической функции мутантного фермента.

Помимо мутаций с заменой оснований, внутригенная супрессия касается также мутаций со сдвигом рамки.

Внегенная супрессия также присуща как миссенс-мутациям, так и нонсенс-мутациям со сдвигом рамки. Внегенная супрессия миссенс-мутаций — результат изменений в структуре тРНК, затрагивающих специфичность взаимодействий между кодоном и антикодоном и между тРНК и аминокислотой. В любом случае мутантная тРНК может включить в синтезирующуюся полипептидную цепь другую аминокислоту вместо той, которая кодируется триплетом с миссенс-мутацией. Один из наиболее изученных примеров такой супрессии — изменение нуклеотидов в антикодоне тирозиновой тРНК у *E.coli* с 3'-UUC-5' на 3'-AUC-5' (рис. 8.4). Подобная супрессия удается лишь в том случае, если подставленная напротив нонсенс-кодона аминокислота не нарушит нормального функционирования белка. Следует подчеркнуть, что для нонсенс-супрессоров характерна кодон-специфичность, но не ген-специфичность. Это означает, что супрессорная мутация способна восстановить активность различных генов независимо от того, где локализованы мутации.

Литература к разделу 8.1.4

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 157–160.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 622–624.

8.1.5. Причины мутирования

Мутации бывают спонтанными, т. е. возникающими в природе без видимых причин, и индуцированными различными мутагенами.

Все типы мутаций могут происходить спонтанно. Долгое время генетики полагали, что спонтанные мутации индуцируются мутагенами окружающей среды, такими как естественный фон радиации и загрязнение среды химическими соединениями-мутагенами. Однако, как выяснилось, хотя частота спонтанных мутаций и очень низка, она слишком высока для действия одних только внешних мутагенов. Поскольку большинство повреждений ДНК исправляется клеточными репарирующими системами, в виде мутаций фиксируется лишь их незначительная часть. Поэтому существенной составляющей спонтанного мутагенеза являются нарушения в системе репарации.

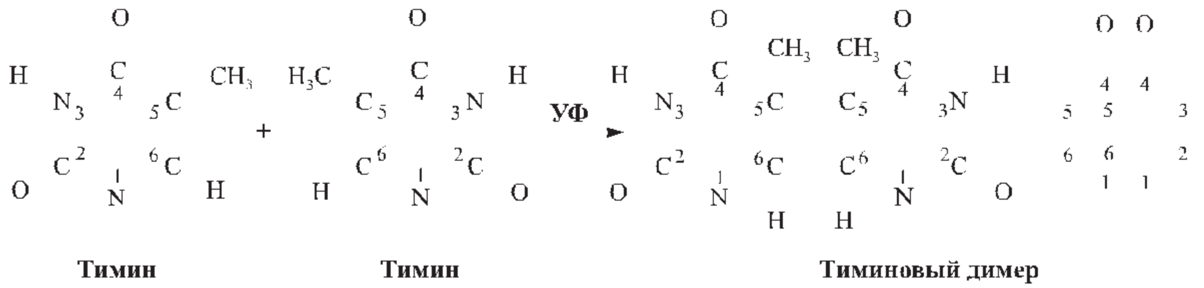
Спонтанные мутации возникают в результате ошибок в репликации ДНК или изменений в химических составляющих молекулы ДНК. Третьей причиной спонтанных мутаций являются перемещения мобильных элементов генома.

В результате перемещений атомов водорода из одних положений в пурине или пиримидине в другие более стабильные кетоформы тимина и гуанина, а также аминоформы аденина и цитозина подвергаются таутомеризации, превращаясь в менее стабильные энольную и иминоформы соответственно. Следствием таких переходов может быть образование A–C и G–T-пар, ведущее к появлению спонтанных транзиций и трансверсий.

Огромный вклад механизмов репликации ДНК в возникновение спонтанных мутаций связан с ошибками в работе ДНК-полимераз и химической модификацией цитозина. Подсчитано, что ошибки в ходе полимеризации ДНК возникают с частотой примерно 10^{-5}. Корректорная 3'–5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз снижает эту частоту до 10^{-10} в расчете на включающийся нуклеотид. Репаративные процессы еще более уменьшают возможность подобных ошибок. Тем не менее число их все же достаточно для возникновения генетически наследуемых изменений в данном гене, регистрируемых как спонтанные мутации.

У *E.coli* большое число спонтанных мутаций возникает путем химической модификации одного из четырех оснований, присутствующих в ДНК. Наиболее часто встречается модифицированное основание 5-метилцитозин. Фермент метилаза добавляет группу $–CH_3$ к некоторой части цитозиновых остатков в молеку-

Рисунок 8.5



Формирование тиминовых димеров под влиянием ультрафиолетового излучения [Russell, 1998. P. 630]. Два компонента димера ковалентно связаны таким образом, что двойная спираль ДНК нарушается в этом положении

ле ДНК (в специфических ее участках). В результате происходят транзиции от G–C к A–T. В этих участках образуются «горячие» точки спонтанных мутаций (см. рис. 8.1).

Известны особые гены-мутаторы. Мутации в одних из них *(mutS, mutL* у *E.coli)* увеличивают спонтанную мутабильность в 100 раз, в других *(mutT, mutD, mutH)* — в 10^3–10^5 раз. Эти гены взаимодействуют с другими генами, связанными с процессами репликации, репарации и рекомбинации ДНК.

Среди факторов, индуцирующих мутации, следует указать ионизирующие и неионизирующие излучения, а также химические агенты.

Активными мутагенами являются рентгеновское и ультрафиолетовое излучение. Проникая в ткани, ионизирующие излучения разрывают химические связи, в том числе и в ДНК. В результате возникают хромосомные перестройки и разрывы, а также точковые мутации.

Ультрафиолетовый свет не является ионизирующим, тем не менее это довольно эффективный мутаген. Связано это с тем, что пурины и пиримидины интенсивно поглощают ультрафиолет с длиной волны 254–260 нм, в результате чего возникают фотохимические изменения в структуре ДНК. Одним из последствий ультрафиолетового облучения является формирование ненормальных химических связей между молекулами пиримидинов, соседствующими в одной и той же цепи ДНК или находящимися на противоположных цепях. Чаще всего образуются тиминовые димеры (рис. 8.5). Со значительно меньшей частотой образуются димеры других пиримидинов. Возникновение димера приводит к выпячиванию в цепи ДНК. Большинство таких нарушений репарируется, оставшиеся нерепарированными приводят к мутациям.

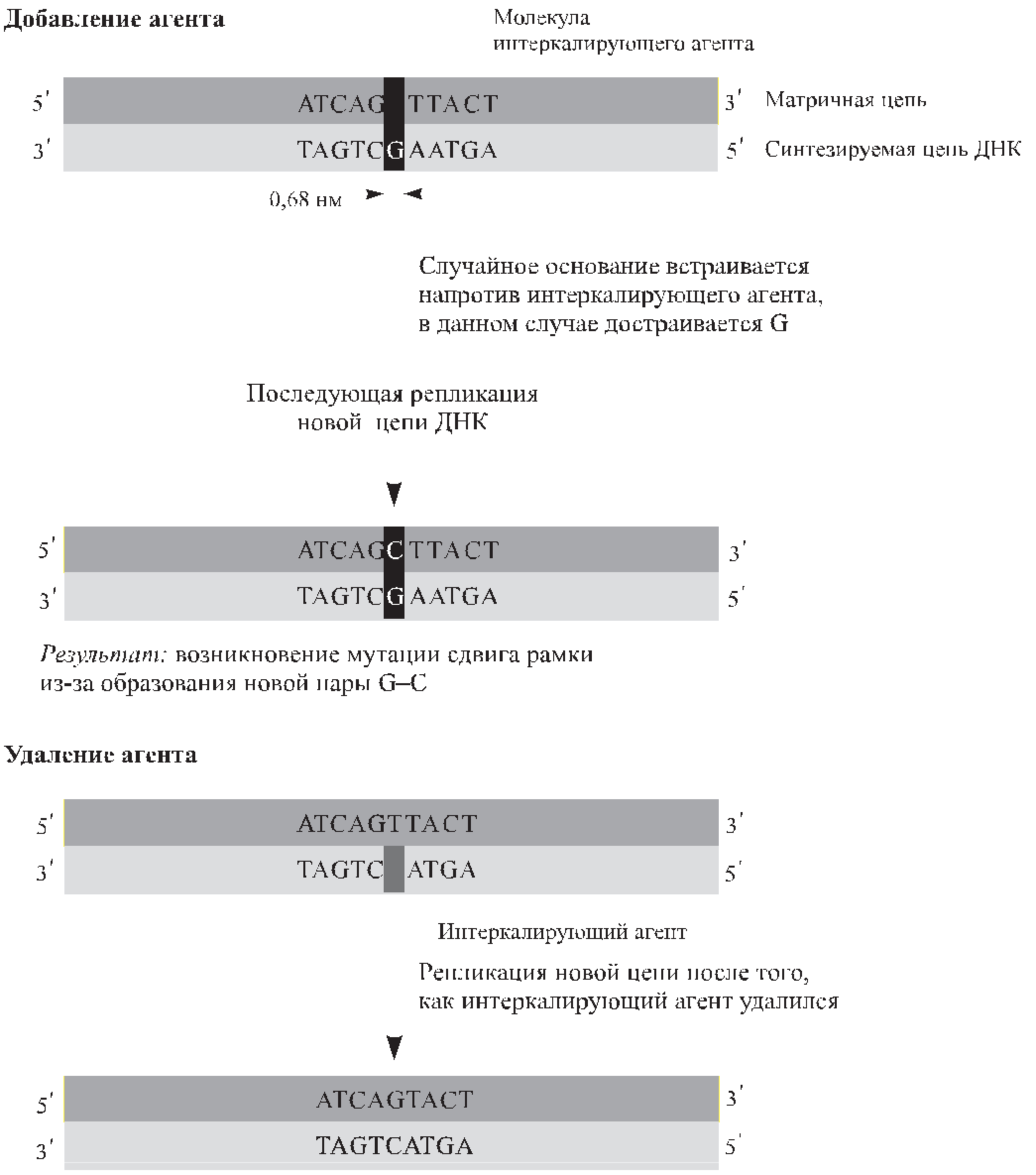
Многие химические соединения могут индуцировать мутации. Это аналоги оснований, соединения, модифицирующие основания, интеркалирующие агенты.

Аналоги оснований по молекулярной структуре очень похожи на основания, нормально входящие в цепи ДНК. Эти соединения приводят к мутациям потому, что они могут существовать в альтернативных (таутомерных) состояниях. В каждом из двух состояний аналоги спариваются с разными нормальными основаниями, в результате чего может произойти их замена. Например, 5-бромурацил в нормальном состоянии спаривается с аденином, в более редком таутомерном состоянии — с гуанином. В связи с этим 5-бромурацил индуцирует транзицию, когда включается в ДНК в одном состоянии, затем в следующем раунде репликации ДНК превращается в более редкую таутомерную форму. Другим широко известным аналогом оснований является 2-аминопурин.

Агенты, модифицирующие основания. Ряд химических агентов действуют как мутагены, непосредственно модифицируя химическую структуру и свойства оснований. К ним относятся дезаминирующие, гидроксилирующие и алкилирующие агенты.

Азотистая кислота (HNO_2) осуществляет окислительное дезаминирование, т. е. удаляет аминогруппы ($–NH_2$) из таких оснований, как гуанин, цитозин и аденин. В результате дезаминирования гуанина азотистой кислотой образуется ксантин, но, так как это пуриновое основание имеет тот же тип спаривания, мутация не проявляется. Однако когда модифицируется цитозин, получается урацил (который спаривается с аденином). В итоге происходит транзиция от C–G к T–A в ходе акта репликации. Аналогичным образом азотистая кислота модифицирует аденин в гипоксантин — основание, спаривающееся с цитозином, а не с тимином, что продуцирует транзицию A–T в G–C.

Рисунок 8.6



Мутации, индуцируемые интеркалирующими агентами [Russell, 1998. P. 635]

Мутации, индуцируемые азотистой кислотой, могут ревертироваться повторной обработкой.

Другим мутагеном, модифицирующим основания, является гидроксиламин (NH_2OH), который специфически реагирует с цитозином, добавляя гидроксильную группу (–OH), в результате чего он спаривается уже с аденином, а не с гуанином. Таким образом, обработка гидроксиламином индуцирует транзиции C–G в T–A. Реверсии мутаций к норме в данном случае невозможны.

И наконец, рассмотрим алкилирующий агент метилметансульфонат (ММС), алкилирующий гуанин, т. е. он добавляет группы $–CH_3$ или $–CH_2CH_3$ к кислороду в 6-й позиции, в результате чего образуется O^6–алкилгуанин или O^6-метилгуанин. Метилированный гуанин будет спариваться с тимином, а не с цитозином, как раньше, давая транзицию G–C в A–T.

Интеркалирующие агенты. К этой группе мутагенов относятся профлавин, акридин, этидиумбромид и вещество, называемое ICR-170. Они встраиваются (интеркалируют) между прилежащими нуклеотидами в одной или обеих цепях ДНК.

Если интеркалирующий агент встраивается между прилегающими основаниями в матричной цепи ДНК (рис. 8.6), дополнительное осно-

Рисунок 8.7

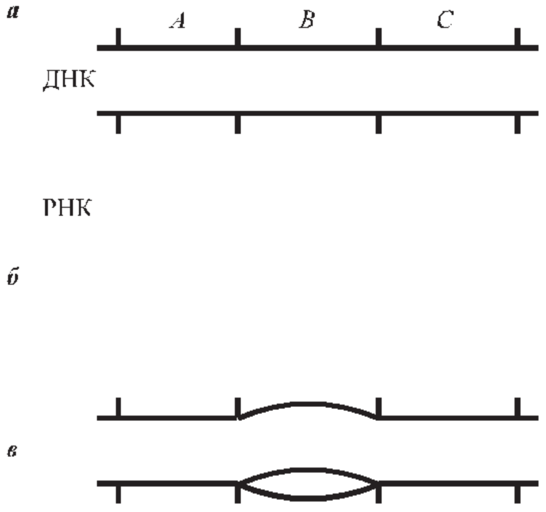


Схема ген-специфического мутагенеза [Salganik et al., 1980]:

а — РНК транскрибируется с генов *A*, *B*, *C*; *б* — пришивка высокоактивных химических групп к транскрипту гена *B*; *в* — химическая модификация гена *B* с помощью соответствующего транскрипта, несущего высокоактивные группы

вание, в данном случае G, включается во вновь синтезируемую цепь и возникает мутация сдвига рамки. Похожая ситуация будет и при удалении интеркалирующего агента.

Сайт-специфический мутагенез. Ни спонтанные, ни индуцированные мутации не возникают в каких-то особых генах, они случайно распределены по всему геному. Однако среди генетиков постоянно ставилась задача получения мутаций в генах, которые представляли для них особый интерес.

На рис. 8.7 показана схема одного из таких экспериментов, проведенного на бактериофаге T7.

С развитием методов генной инженерии стало возможным выделять, клонировать и обрабатывать мутагенами ДНК в системе *in vitro* и затем вводить ее назад в клетку (рис. 8.8).

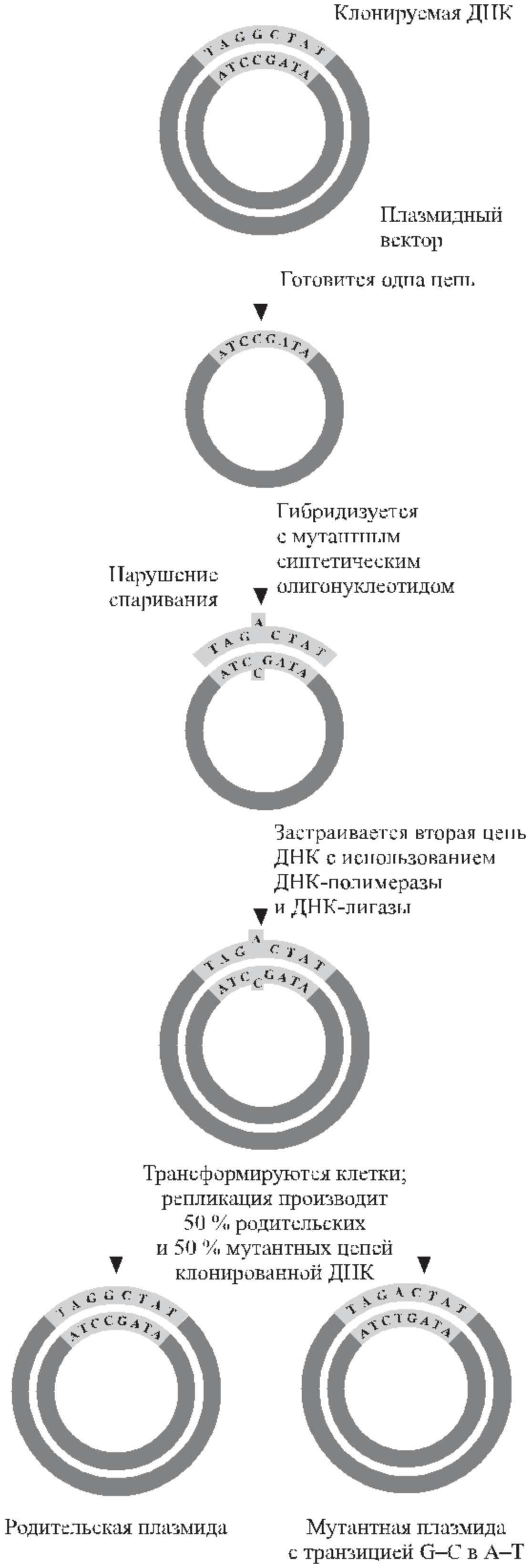
Литература к разделу 8.1.5

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 160–186.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 624–636.

Salganik R. I., Dianov G. L., Ovchinnikova L. P., Voronina E. N., Kokoza E. B., Mazin A. V. Gene-directed mutagenesis in bacteriophage T7 provided by polyalkylating RNAs complementary to selected DNA sites // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1980. Vol. 77. P. 2796–2800.

Рисунок 8.8



Упрощенная схема сайт-специфического мутагенеза *in vitro* [Russell, 1998. P. 636]

8.2. МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК

Как эукариотические, так и прокариотические клетки имеют системы, репарирующие возникшие повреждения ДНК. Каждый механизм реализуется с помощью определенного набора ферментов. Некоторые из систем непосредственно корректируют повреждения, в то время как другие вначале вырезают повреждения, образуя одноцепочечные бреши, и затем синтезируют новую цепь ДНК, застраивая брешь. Если эти системы не способны скорректировать все повреждения, результатом будут мутации. Если мутаций возникнет слишком много, клетка погибнет.

8.2.1. Прямая коррекция мутационных повреждений

Репарация за счет проверки ДНК-полимеразой. В бактериальных системах частота ошибочных встроек нуклеотидов в ходе репликации составляет 10^{-7}–10^{-11} на одно событие репликации. Однако ДНК-полимераза, когда она синтезирует новую цепь, делает ошибки примерно в 100 раз чаще. Расхождение между этими значениями связано с тем, что сам фермент производит проверку встраивания (см. разд. 6.3). Большинство бактериальных полимераз в дополнение к полимеризующей активности в направлении 5'–3' имеет экзонуклеазную активность в направлении 3'–5'. Если встраивается «неправильный» нуклеотид, ошибка чаще всего (хотя и не всегда) распознается полимеразой, вероятно, из-за того, что в этом месте в двойной спирали образуется пузырь или впячивание. Или поскольку «неправильный» нуклеотид не может сформировать водородную связь с комплементарным основанием, полимераза не добавит нуклеотид к растущему 3'-OH-концу. Процесс репликации останавливается до тех пор, пока «неправильный» нуклеотид не будет удален, а нужный не встанет на его место. У *E.coli* есть ген, называемый мутатором (*mutD*), при мутации которого изменяется субъединица ε (эпсилон) ДНК-полимеразы III. Мутация гена *mutD* обусловливает дефект в системе проверки встроенных нуклеотидов в направлении 3'–5'. В результате многие из неправильно встроенных нуклеотидов остаются нерепарированными и с той или иной вероятностью возникают мутации во всех генах.

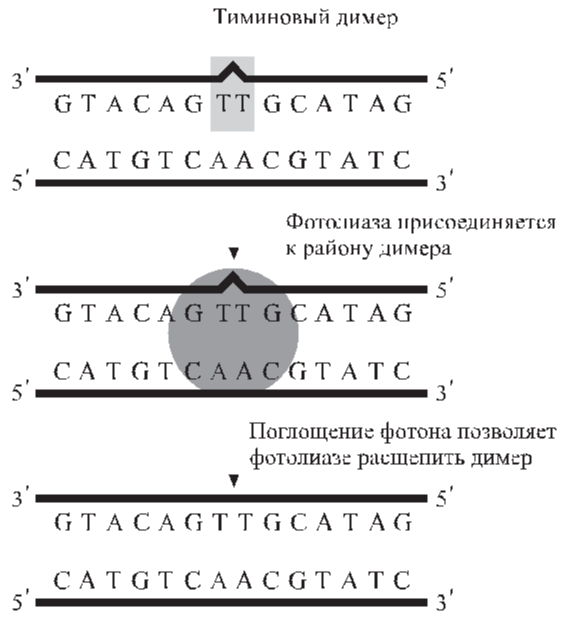
У эукариотических ДНК-полимераз 3'–5'-экзонуклеазной активности не обнаружено.

Фотореактивация. Возможность репарации ДНК была обнаружена в 1949 г., когда А. Кельнер, Р. Дюльбекко и И. Ф. Ковалев независимо друг от друга установили, что освещение видимым светом актиномицетов, бактериофага и парамеций восстанавливает их жизнеспособность после УФ-облучения в летальных дозах. По совету будущего нобелевского лауреата М. Дельбрюка это явление было названо фотореактивацией. Тиминовые димеры, возникшие в результате УФ-облучения, разрушаются, и тимины возвращаются к своей исходной форме под действием видимого света (рис. 8.9).

Фотореактивация катализируется ферментом фотолиазой, кодируемой геном *phr*. Этот фермент, когда активируется фотоном света, расщепляет димер на исходные составляющие. Линии с мутациями гена *phr* имеют дефекты световой репарации. Фотолиаза обнаружена у прокариот и у низших эукариот, однако ее нет, например, у человека.

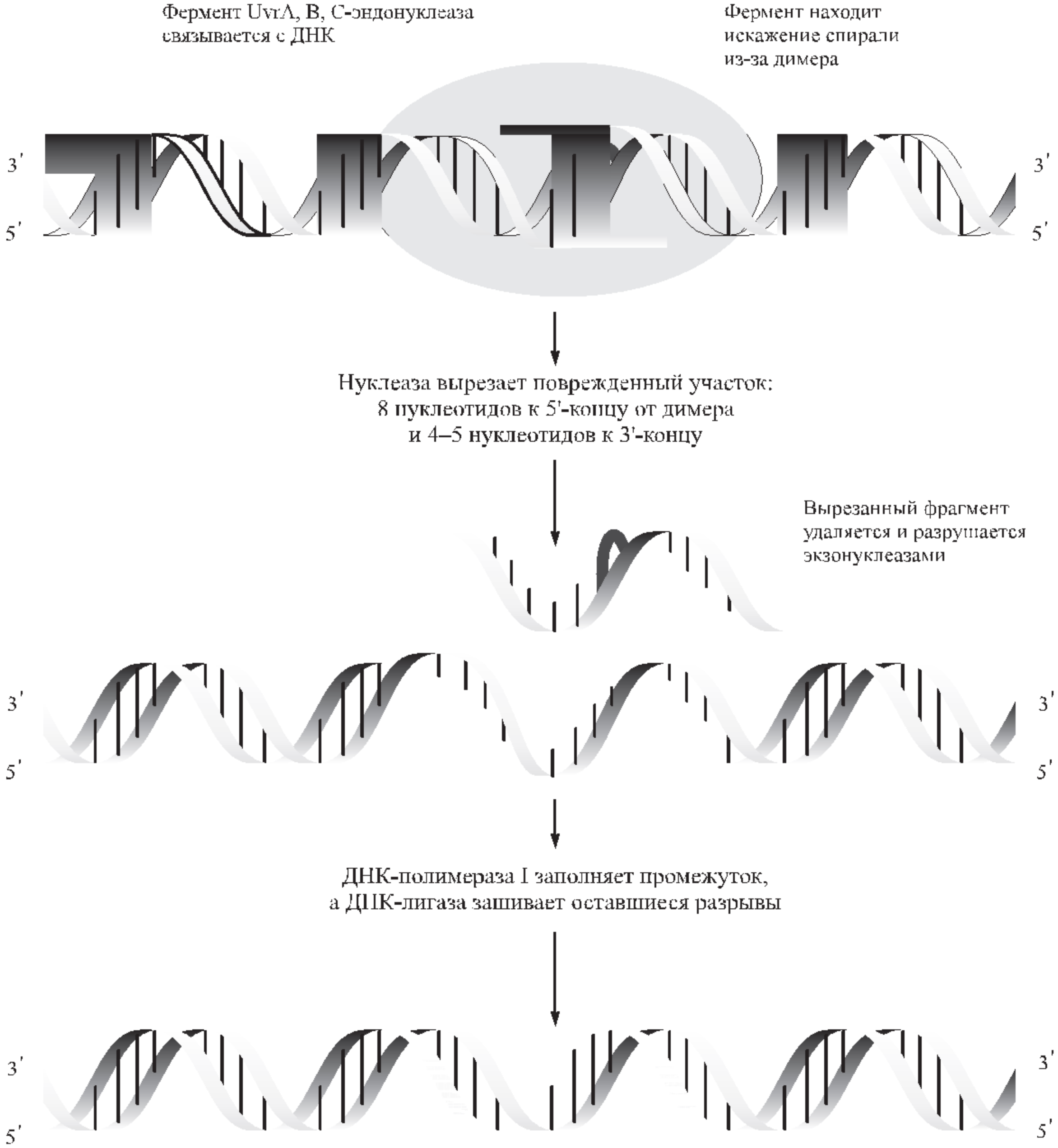
Репарация алкилирующих повреждений. Генетические повреждения, вызываемые присоединением алкильных или метильных групп, могут репарироваться в результате удаления этих групп специфическими ферментами. Следует заметить, что в этой репарирующей системе модифицированное основание не удаляется из ДНК. В данном случае фермент, кодируемый геном *ada* (O^6-метилгуанинтрансфераза),

Рисунок 8.9



Репарация тиминового димера фотореактивацией [Russell, 1998. P. 638]

Рисунок 8.10



Эксцизионная репарация пиримидинового димера и других нарушений ДНК, инициированная ферментом UvrA, B, C-эндонуклеазой [Russell, 1998. P. 639]

распознает O^6-метилгуанин в ДНК и удаляет метильную группу, возвращая основание в исходную форму.

Действие полинуклеотидлигазы. Еще один тип реакций прямой репарации был обнаружен для однонитевых разрывов ДНК, индуцируемых, например, ионизирующим излучением. При этом с помощью фермента ДНК-полинуклеотидлигазы происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК.

8.2.2. Механизмы репарации, связанные с эксцизией пар оснований

Существуют сложные реакции восстановления, напоминающие хирургические вмешательства в структуру ДНК, когда поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, а затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом. Они были открыты

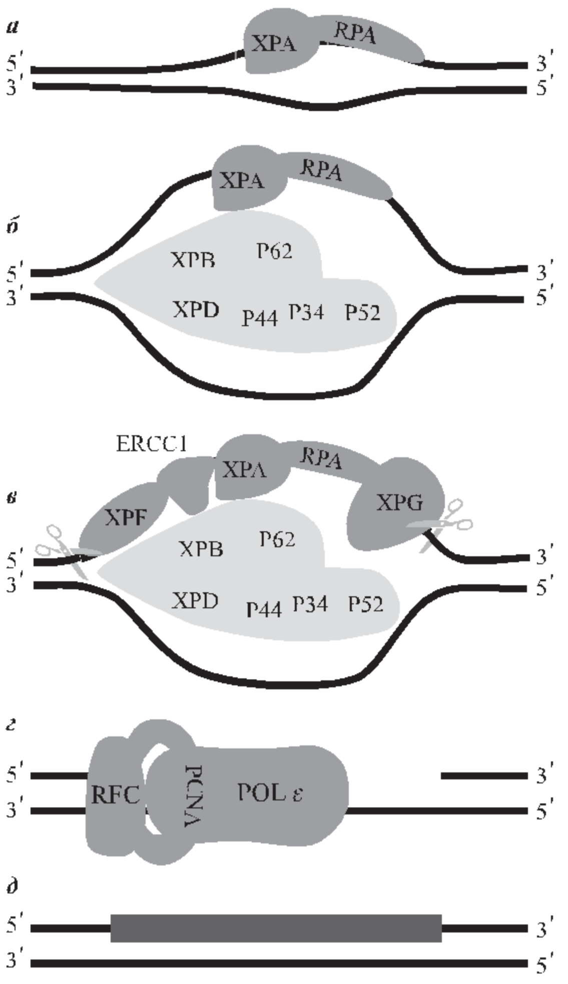
в 1964 г. группами Р. Бойса, П. Говарда-Флендерса, Р. Сетлоу и У. Кэрриера. Эти авторы выявили несколько УФ-чувствительных мутантов у *E.coli*, которые после облучения ультрафиолетом обнаруживали более высокий, чем в норме, уровень мутаций, индуцируемых в темноте. Эти мутации были названы *uvrA* (UV-repair — репарация УФ). Мутанты *uvrA* могут репарировать димеры только с потреблением света, т. е. они имеют нормальную систему фотореактивации. Поэтому предположили, что должна быть другая система репарации, которая не требует света. Эта система была названа темновой или эксцизионной репарацией. Так как клетки дикого типа могут репарировать димеры в темноте, аллель дикого типа называют $uvrA^{+}$.

Эксцизионная система репарации у *E.coli* корректирует не только пиримидиновые димеры, но и другие серьезные нарушения ДНК. Упрощенная схема эксцизионной репарации показана на рис. 8.10. Нарушение опознается UvrA, B, C-эндонуклеазой, мультисубъединичным ферментом, кодируемым тремя генами — *uvrA, uvrB* и *uvrC*. Этот фермент делает надрез в поврежденной цепи через 8 нуклеотидов в 5'-сторону от димера и второй надрез — через 4 нуклеотида с 3'-стороны. Затем 12-нуклеотидная цепь, содержащая повреждение, удаляется, брешь заполняется с помощью 5'–3'-полимеризующей активности ДНК-полимеразы I и запечатывается ДНК-лигазой.

Более детальная модель для эукариот показана на рис. 8.11. Вначале повреждения ДНК опознаются XPA-белком (xeroderma pigmentosum-A) в ассоциации с RPA (рис. 8.11, *а*), затем привлекается фактор транскрипции TFIIH, показанный на этом рисунке состоящим из 6 субъединиц, включая XPB и XPD, чья геликазная активность «открывает» структуру ДНК (рис. 8.11, *б*). Это позволяет специфическим нуклеазам ERCC1–XPF и XPG надрезать ДНК по обе стороны от повреждения (*в*). Точная функция XPC-белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК, до конца не ясна, но известно, что он требуется до надрезания ДНК нуклеазами. ДНК-полимераза ε (эпсилон) и вспомогательные белки RFC и PCNA застраивают образовавшуюся брешь (*г*). Фрагмент новой цепи соединяется со старой цепью ДНК-лигазой (*д*).

Эксцизионная репарирующая система найдена у большинства изученных организмов. Иногда возникают ошибки в схеме эксцизионной репарации, и эти ошибки являются дополнительным источником мутаций, индуцируемых УФ-облучением.

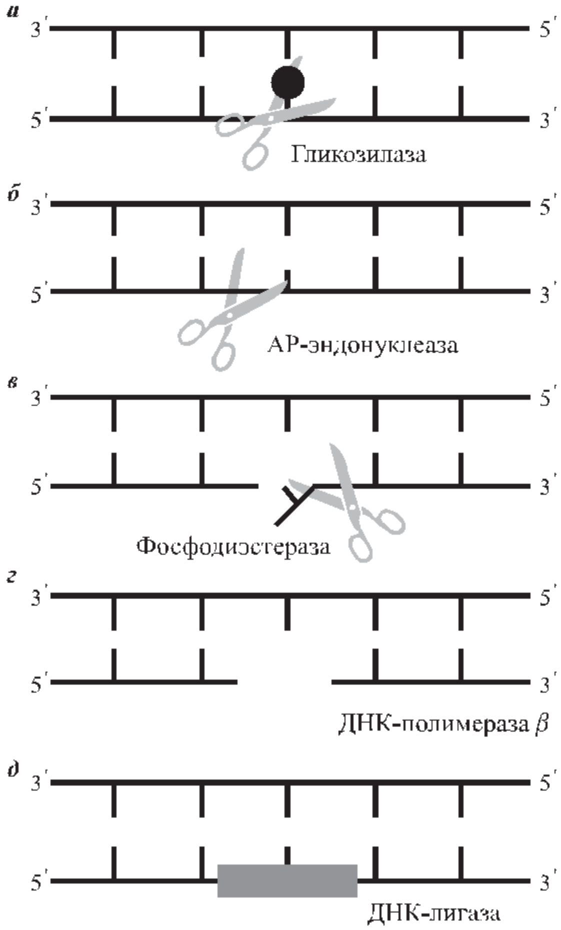
Рисунок 8.11



Модель репарации эксцизией нуклеотидов [Lehmann, 1998].
Объяснения в тексте

Измененные азотистые основания репарируются другими способами. Клетки содержат фермент гликозилазу, которая может обнаружить ненормальное основание и катализировать его отделение от дезоксирибозы путем разрушения гликозидной связи между основанием и сахаром (рис. 8.12, *а*). Эта каталитическая активность оставляет брешь в ДНК, где удалено основание. Эта брешь называется AP-сайтом (апуриновым, если нет A или G, или апиримидиновым, если отсутствуют C или T). Фермент AP-эндонуклеаза опознает наличие бреши и разрезает остов ДНК на 5'-конце от поврежденного основания (рис. 8.12, *б*). Затем удаляется фосфат на 5'-конце надрезанной нити (*в*) с помощью фосфодиэстеразной активности ДНК-полимеразы β. Образовавшаяся брешь из одного нуклеотида заполняется ДНК-полимеразой β (*г*) и запечатывается либо

Рисунок 8.12



Модель репарации гликозилазами [Lehmann, 1998. P. 147]

Рисунок 8.13

Ник-трансляция в ходе репарации гликозилазами [Russell, 1998. P. 639]

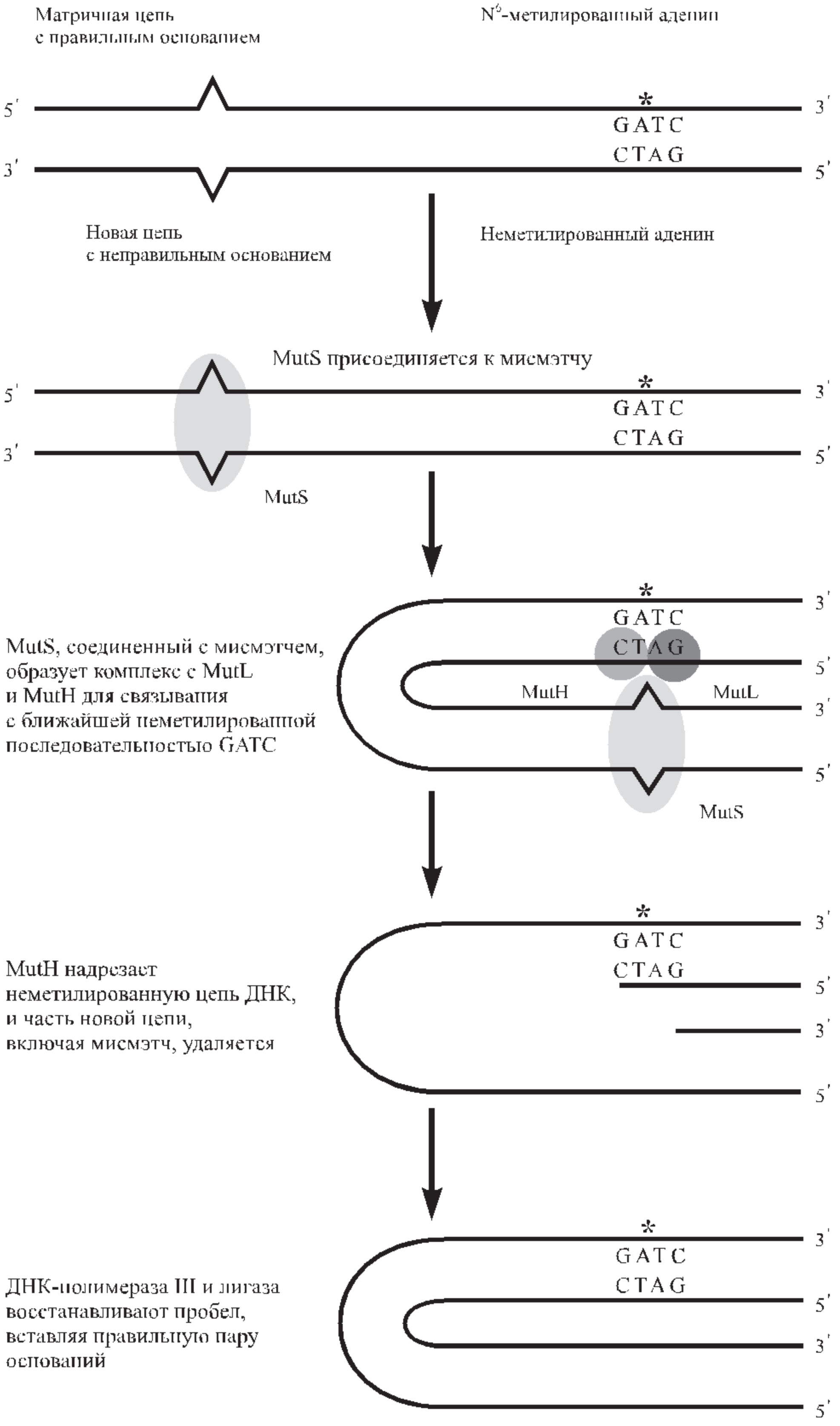
ДНК-лигазой I, либо ДНК-лигазой II со вспомогательным белком XRCC1 (*д*). К настоящему времени описано много типов ферментов-гликозилаз, каждый из которых узнает разнообразные поврежденные основания, такие как метилированные, окисленные, восстановленные, дезаминированные, а также основания, связанные с формамидными группировками.

Активность ДНК-полимеразы I в этой системе репарации, когда фермент создает новую цепь ДНК и удаляет нуклеотиды впереди растущей цепи ДНК, называется ник-трансляцией (рис. 8.13).

Репарация неспаренных оснований. Довольно часто (у *E.coli* один раз на 10 тпн, у эукариот еще чаще) во время репликации ДНК происходят ошибки спаривания, в результате которых вместо комплементарной пары нуклеотидов А–Т или G–C в дочернюю цепь ДНК оказываются включенными нуклеотиды, не комплементарные нуклеотидам в материнской нити (их называют мисмэтчами — от англ. mismatch). Такие ошибки корректируются с помощью мисмэтч-системы репарации. У *E.coli* в процесс инициации репарации по этой схеме вовлечены продукты четырех генов: *mutS, mutL*, *mutH* и *mutU* (рис. 8.14). Как было выяснено позже, *mutU* есть не что иное, как ген *uvrD*, кодирующий геликазу II. Ясно, что неправильное спаривание (ошибка репликации) может затронуть только дочернюю нить ДНК: матричная нить в процессе репликации остается неизменной. Следовательно, система репарации мисмэтчей должна оперировать на дочерней цепи и производить замену некомплементарных оснований только в ней. Клетки при этом используют важное различие в структуре матричной и дочерней нитей, найденное в 70-х гг. Оказалось, что вскоре после окончания репликации специальные ферменты — метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях GATC. Поэтому во время следующего раунда репликации нити ДНК оказываются различимыми: материнская нить несет метилированные аденины, а в дочерней их модификация начнется только по окончании репликации. Пока они остаются неметилированными, клетки должны успеть отрепарировать мисмэтчи.

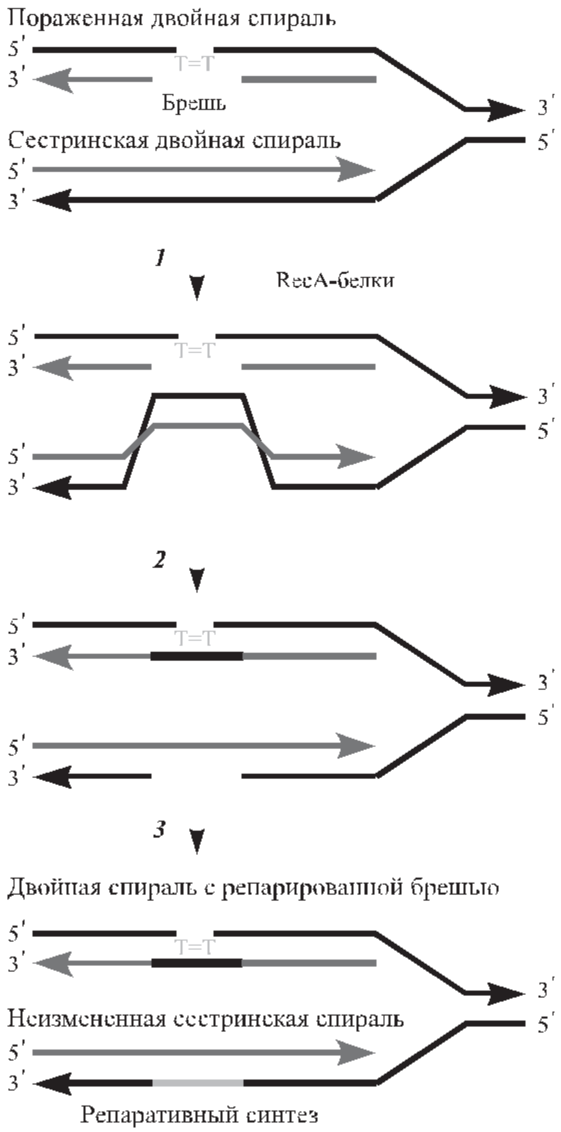
Процесс начинается с того, что к некомплементарной паре мисмэтча присоединяется

Рисунок 8.14



Механизм мисмэтч-системы репарации [Russell, 1998. P. 641]

Рисунок 8.15



Пострепликативная репарация ДНК [Сойфер, 1997].

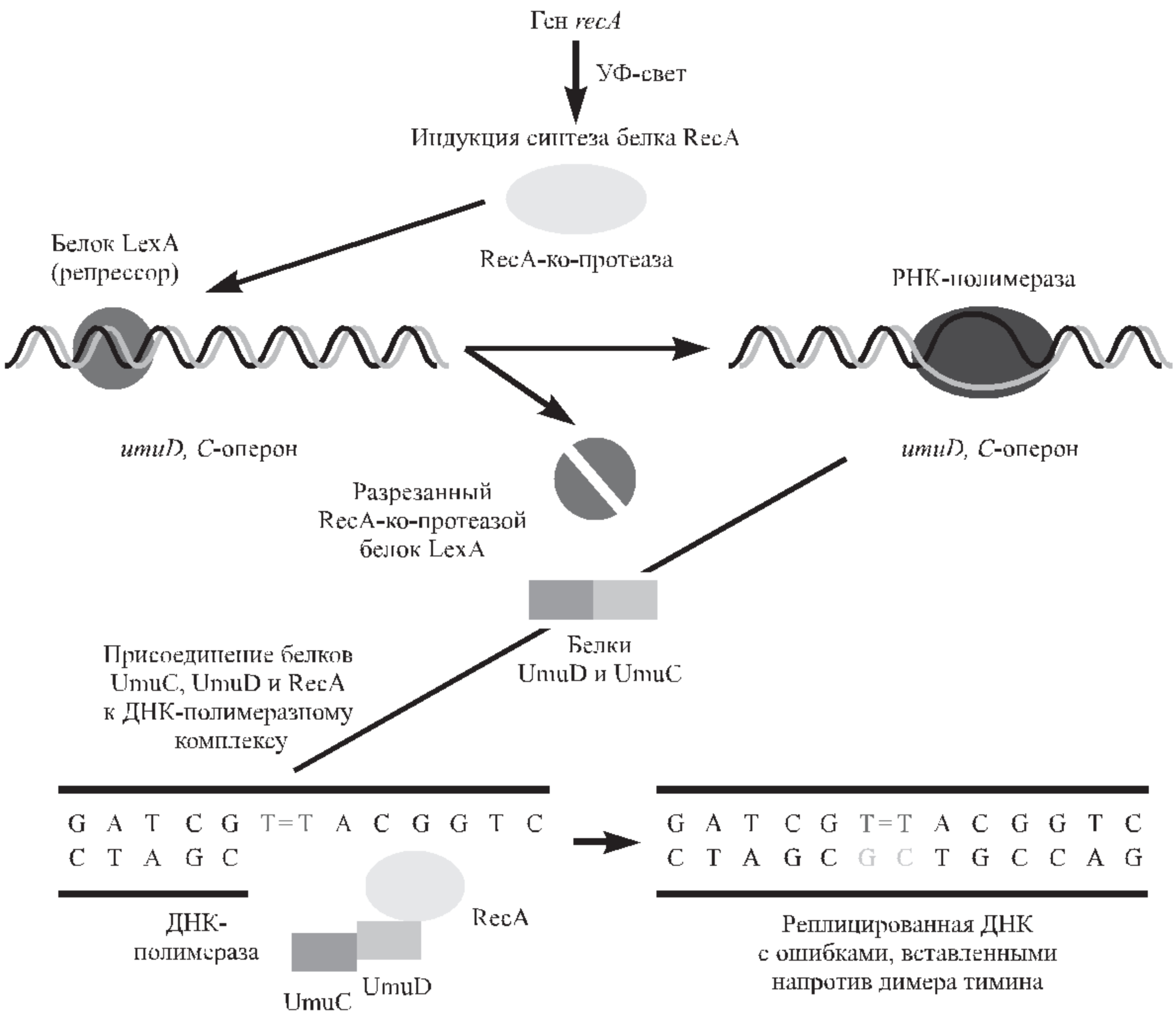
Если до начала репликации ДНК из нее не были устранены все дефекты, то одна из нитей материнской молекулы будет нести повреждение (светло-серым цветом выделен димер тимина), а комплементарная ей нить будет свободна от повреждений (нити материнской молекулы показаны черным цветом). На поврежденной нити репликация завершится тем, что напротив димера тимина в заново синтезированной нити (темно-серого цвета) окажется брешь, в то время как сестринская двойная спираль не будет нести повреждения. После этого может произойти пострепликативная репарация поврежденного участка: *1* — молекулы белка RecA (белые) присоединяются к зоне бреши; *2* — под контролем белков RecA происходит рекомбинация — участок комплементарной цепи сестринской нити (черная) переносится в район бреши; *3* — брешь в сестринской ДНК застраивается в ходе репликативного синтеза (застроенный участок показан светло-серым цветом); концы новой и старой нитей соединяются лигазой

белок MutS. С ним тут же связываются белок MutL и две молекулы белка MutH. Белок MutH распознает участок GATC и обладает эндонуклеазной активностью, с помощью которой ДНК в этой последовательности может быть надрезана вблизи аденина в неметилированной нити. Надрезы могут быть внесены как в 5'-, так и в 3'-положение относительно аденина. Мультимолекулярный комплекс, составленный из этих белков, массивен и связывает длинный фрагмент ДНК. Последний протягивается через комплекс до тех пор, пока два участка GATC, расположенные по обе стороны от мисмэтча, удерживаемого белком MutS, не окажутся захваченными молекулами белка MutH. Иногда расстояние между участками GATC может превышать несколько тысяч нуклеотидов. Благодаря своей эндонуклеазной активности MutH разрезает дочернюю нить. Если такой надрез сделан с 5'-стороны от аденина, к нему присоединится еще один белок — экзонуклеаза, которая расщепит нити ДНК в направлении 5'–3'. Этот белок разрушит всю дочернюю нить до места неправильного спаривания и даже пройдет несколько дальше. Если же первичный надрез будет сделан с 3'-стороны мисмэтча, то потребуется другая экзонуклеаза, двигающаяся по ДНК в направлении 3'–5'. Ее работа будет продолжаться до тех пор, пока не будет устранен участок мисмэтча. Затем в обоих случаях, как с 5'–3'-, так и с 3'–5'-экзонуклеазой, бреши должны быть застроены ДНК-полимеразой, а концы воссоединены с помощью лигаз. Разумеется, для высвобождения концов нитей после внесения первичных разрезов молекула ДНК должна быть расплетена (требуется белок хеликаза), нужны также источники энергии в виде ATP, а для застройки брешей — дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Процесс обнаружен в клетках человека, дрожжей и некоторых других организмов.

Пострепликативная, или рекомбинационная, репарация (ПРР). Этот способ восстановления целостности ДНК заключается в репарации пробелов, образующихся в дочерних цепях напротив не удаленных в ходе репликации димеров пиримидинов. Основная часть таких пробелов репарируется путем рекомбинационных обменов между двумя сестринскими молекулами ДНК. В клетках процесс ПРР контролируется по крайней мере 17 генами.

Из комплементарной нити матричной ДНК (она была свободна от дефектов), на которой репликация уже завершена, с помощью белка RecA вырезается участок ДНК, равный по длине участку бреши, и встраивается в брешь (рис. 8.15). Затем лигазы соединяют концы

Рисунок 8.16



Индуцируемая УФ-светом SOS-репарация [Сойфер, 1997].

Большие дозы УФ-облучения приводят к возникновению большого числа повреждений ДНК, часть которых остается неотрепарированной к моменту начала репликации. В этих условиях активируется синтез ко-протеазы RecA-белка, которая участвует в расщеплении (протеолизе) многих белков. В частности, RecA-ко-протеаза может узнать и разрезать другой белок — кодируемый геном *lexA* и являющийся репрессором почти 20 генов, в том числе оперона *umuD, C*. Разрушение LexA-белков открывает возможность начать транскрипцию многих оперонов: РНК-полимераза связывается с их промоторами, в частности с промотором оперона *umuD, C*, и начинает транскрипцию генов *umuC* и *umuD*. Вновь синтезированные белки UmuC и UmuD способны присоединиться к комплексу ДНК-полимераза III–RecA-белок, изменить его, после чего репликационный комплекс продолжит синтез дочерней нити ДНК на поврежденной матрице и подставит в участках напротив повреждений любые случайные нуклеотиды, только чтобы пройти эти участки. Репликация ДНК таким образом завершится, однако дочерняя нить будет нести мутации напротив дефектов в материнской нити. В настоящее время стало ясно, что даже эта довольно сложная схема нуждается в значительном усложнении, например, белок UmuD под действием RecA-ко-протеазы расщепляется на две части, и только одна из них ответственна за введение ошибок во вновь синтезированные дочерние цепи ДНК

вставленного фрагмента с концами нормально синтезированного участка дочерней нити. После этого другие ферменты репарации устраняют дефект в исходно поврежденной нити, и ДНК становится «залеченной». Одновременно брешь, оставшаяся после вырезания участка из материнской нити, застраивается ДНК-полимеразой I и концы соединяются лигазой.

SOS-репарация. Что случится, если клетка подошла к моменту, когда нужно реплицировать ДНК, но в ней остались повреждения, которые ни одна из описанных выше систем репарации не смогла устранить? Репликация застопорится на первом же неустраненном повреждении, и если их в ДНК много, клетка должна погибнуть. В этих условиях в клетках

Таблица 8.1. Распространение систем репарации среди представителей живого мира [Сойфер, 1997]

Тип репарации	Бактерии	Растения	Насекомые	Человек
Фотореактивация	|	|	|	|
Репарация O^6-гуанинов	+	+	+	?
Эксцизионная репарация оснований	+	?	?	+
Эксцизионная репарация нуклеотидов	+	+	+	+
Мисмэтч-репарация	+	?	?	+
Пострепликативная репарация	+	+	?	+
SOS-репарация	+	?	?	+

Примечание. Не найдено ферментов репарации в митохондриях эукариот.

активируется еще один крайне рискованный механизм репарации, обнаруженный впервые в 1974 г. М. Радманом. Он установил, что при этом индуцируется синтез белков, которые присоединяются к ДНК-полимеразному комплексу и делают возможным строить дочернюю ДНК напротив дефектных звеньев матричной цепи. Радман назвал этот механизм SOS-репарацией. Принцип метода показан на рис. 8.16. В результате SOS-репарации клетка спасается на этом этапе: ее ДНК оказывается удвоенной, хотя и с ошибкой, и теперь может произойти клеточное деление. Но если жизненно важные функции все-таки безнадежно испорчены, такая клетка позже все равно погибнет.

Данные о распространенности различных репарирующих систем в живом мире представлены в табл. 8.1.

С дефектами систем репарации связаны некоторые наследственные болезни человека.

В 1968 г. Дж. Кливер нашел, что причиной неизлечимой болезни – пигментной ксеродермы являются дефекты разных репарирующих систем. У носителей болезни под действием обычного солнечного света, в котором всегда присутствуют УФ-лучи, на коже возникают красные пятна, которые постепенно переходят в незарастающую коросту, чаще всего трансформирующуюся в раковые опухоли.

В настоящее время известно, что многие другие наследственные болезни человека обязаны своим возникновением повреждениям отдельных этапов различных процессов репарации (табл. 8.2).

Литература к разделу 8.2

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 160–186.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 131–138.

Сойфер В. Н. Репарация генетических повреждений // Соросовский образовательный журн. 1997. № 8. С. 4–13.

Спивак И. М. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК // Цитология. 1999. Т. 41. С. 338–379.

Lehmann A. R. Workshop on eukaryotyc DNA repair genes and gene products // Cancer Research. 1995. Vol. 55. P. 968–970.

Lehmann A. R. Dual functions of DNA repair genes: molecular, cellular, and clinical implications // BioEssays. 1998. Vol. 20. P. 146–155.

Russell P. J. Genetics. 5^{th} ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 637–644.

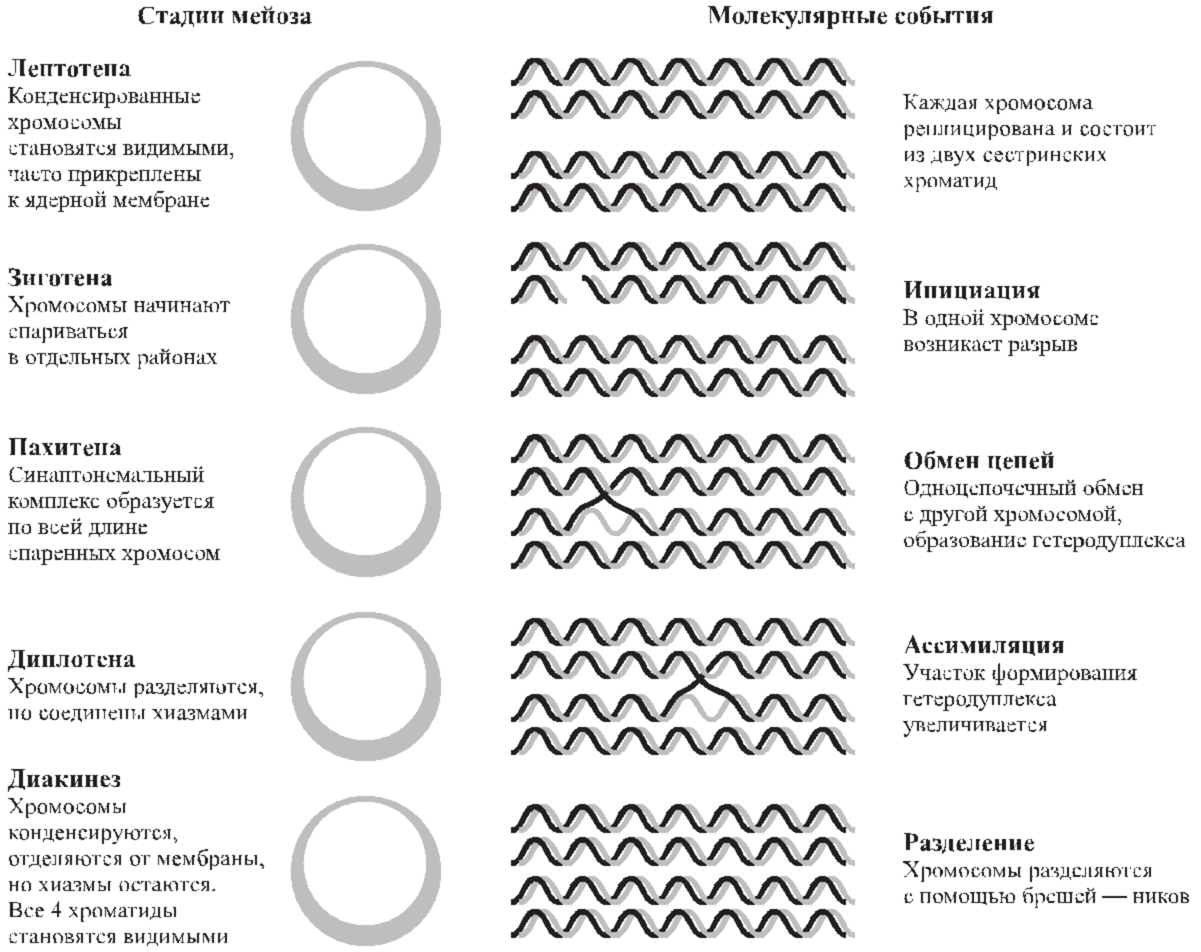
8.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КРОССИНГОВЕРА

Генетическая рекомбинация включает несколько связанных между собой процессов, в результате которых в клетках или организмах, где они происходят, создаются новые комбинации элементов — носителей генетической информации. Рекомбинация между гомологичными хромосомами приводит к интенсивной перетасовке отцовских и материнских генов в ходе мейоза. Как правило, рекомбинационные события, происходящие в соматических клетках либо во время репликации ДНК, либо после нее и проявляющиеся в виде обмена сестринских хроматид, не приводят к изменению генотипа или фенотипа клетки. Это связано с тем, что рекомбинация происходит между соответствующими парами оснований, так что ни один нуклеотид не добавляется и не удаляется из рекомбинантных хромосом.

Таблица 8.2. Примеры наследственных болезней человека, обязанных своим возникновением дефектам репарирующих ферментов [Сойфер, 1997]

Болезнь	Что нарушено в системах репарации	Затронутые гены	Симптомы и последствия заболевания
	Болезни, вызываемые преимущественно дефектами эксцизионной репарации		
Пигментная ксеродерма (ПК). Классическая ПК (ей соответствуют 90 % клинических случаев ПК)	Эксцизионная репарация нуклеотидов (нарушение вырезания, застройки брешей и др.). Разнообразные дефекты репарационных процессов, контролируемых многими генами (так называемые варианты *XP*-генов), активно изучаются в настоящее время	*XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF*, *XPG*	Сверхчувствительность к УФ-свету, ведущая к появлению красных пятен на коже, переходящих в незаживающие коросты и нередко в рак кожи; неврологические расстройства (синдром Де Санктиса–Качиони); поражения век, бровей и глаз. Распространение: 1 случай на 250 тыс. человек в Европе и США; 1 на 400 тыс. человек в Японии
Вариантная ПК (10 % случаев)	Наряду с некоторыми дефектами, присущими классической ПК, наблюдается изменение параметров репликации ДНК	*XP*-гены	
Трихотиодистрофия (ТТД)	Повышенная фоточувствительность ДНК (примерно в 50 % случаев заболеваний), нарушение вырезания димеров тимина или недостаточная скорость застройки брешей после вырезания нуклеотидов, возможны нарушения транскрипции	*XPD* и, возможно, другие гены	Нехватка серы в белках волос и их луковиц, ведущая к ломкости волос, «тигровость» волос (чередование светлых и темных полос по длине волоса, выявляемое под микроскопом); ихтиоз; часто умственная и физическая отсталость; дефекты полового развития; аномалии кожи и зубов; нередки раковые заболевания
Синдром Кокэйна	Дефекты репарирующих эндонуклеаз и дефектность репарации повреждений в транскрибируемых участках ДНК	*CSA*, *CSB*, *XPB*, *XPD*?, *XPG*?	Карликовость, вызываемая задержкой роста и развития в младенческом и детском возрасте при нормальном уровне гормонов роста; глухота; атрофия зрения; кальцификация костей черепа и др.
Анемия Фанкони	Дефекты репарации повреждений от химических мутагенов и канцерогенов (но не УФ-света), обусловленные дефектами эндонуклеаз, дефектами распознавания кросс-сшивок ДНК; пониженная способность к апоптозу после ионизирующего облучения; двукратное удлинение G_2-фазы клеточного цикла и др.	*FAA*, *FAB*, *FAC*	Сверхчувствительность к химическим мутагенам и канцерогенам; уменьшение количества всех клеточных элементов крови; деформация пальцев и другие виды скелетных нарушений; урогенитальные нарушения; микроцефалия; микрофтальмия; дефекты уха и потеря слуха; сердечные и гастроинтестинальные нарушения
	Болезни, вызываемые преимущественно дефектами репаративного синтеза и дефектного клеточного ответа на поражения ДНК		
Атаксия–телеангиэктазия (синдром Луи–Бара)	Дефекты репаративного синтеза ДНК, нарушения клеточного цикла, высокая частота спонтанных хромосомных аномалий, увеличенная чувствительность к ионизирующим излучениям и радиомиметикам, к УФ-свету и агентам сходного действия (таким как 4-нитрохинолиноксид)	Четыре группы комплементации	Проявляется у одного из 40 тыс. новорожденных, основные поражения отмечены в нервной и иммунной системах (мозжечковая атаксия, приводящая к нарушениям координации мышц, шатающейся походке и прогрессирующей умственной отсталости, кожным нарушениям, предрасположенности к раковым заболеваниям и др.)
Синдром Блума	Замедленная репликация ДНК и подавленный репаративный синтез, высокая частота хромосомных аберраций, особенно сестринских хроматидных обменов, по-видимому, обусловленная низкой активностью лигаз (молекулярная причина дефекта пока неясна)		Резко уменьшенный вес новорожденных, задержанный рост; при непродолжительном пребывании на солнечном свету на лице появляется характерная красная пигментация, по форме напоминающая бабочку и вызванная расширением капилляров; повышенная чувствительность к вирусным инфекциям; резко повышенный риск раковых заболеваний
	Болезни, вызываемые преимущественно дефектами мисмэтч-репарации		
Наследственный неполипозный рак прямой кишки	Исследования 1994 г. показали, что наиболее часто болезнь вызывается дефектами мисмэтч-репарации. В настоящее время исследования в данном направлении ведутся во многих лабораториях мира	Аналоги бактериальных генов *mutS* и *mutL*	Наиболее часто встречающаяся наследственная предрасположенность к раку (1 : 200 человек), обусловленная, как правило, каскадом последовательного мутирования специфических локусов в нескольких хромосомах, приводящим к активации нескольких онкогенов

Рисунок 8.17



События мейоза и обмена цепей в молекулах ДНК [Lewin, 1994. P. 968]

Существуют три типа рекомбинации: 1) общая, или гомологичная, 2) сайт-специфическая, 3) случайная, или негомологичная.

Рекомбинация, включающая обмены между гомологичными последовательностями ДНК, называется общей или гомологичной рекомбинацией. У эукариот фрагменты ДНК обмениваются в мейозе, обычно как у самцов (в ходе сперматогенеза), так и у самок (в ходе оогенеза). Это происходит на стадии четырех хроматид, и в обмене участвуют две из четырех хроматид.

Другой тип событий связан с рекомбинацией между специфическими последовательностями и характерен для прокариот и дрожжей. Сайт-специфическая рекомбинация происходит при интеграции фаговых геномов в бактериальную хромосому. В результате рекомбинации обмениваются специфические последовательности фаговой и бактериальной ДНК, обнаруживающие короткие участки гомологии. Ферменты, вовлеченные в это событие, действуют только на особую пару последовательностей-мишеней.

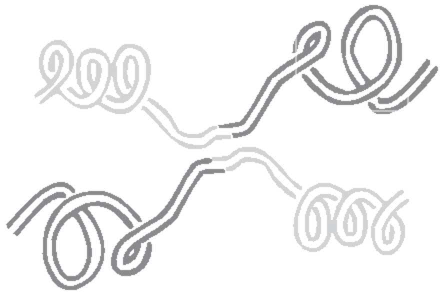
Рекомбинация между негомологичными последовательностями нуклеотидов происходит в клетках прокариот и дрожжей достаточно редко, а в клетках млекопитающих — довольно часто. К негомологичной рекомбинации можно отнести процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в ДНК клеток животных.

8.3.1. Гомологичная рекомбинация

Гомологичная рекомбинация происходит между двумя дуплексными молекулами ДНК. Следует подчеркнуть, что ферменты, участвующие в этом процессе, могут использовать в качестве субстрата любую пару гомологичных последовательностей.

Молекулярные события кроссинговера приурочены к определенным стадиям мейоза (рис. 8.17). Началом профазы мейоза можно считать

Рисунок 8.18



Участок сочленения

Сочленение (joint) объединяет две молекулы ДНК в том месте, где произошел кроссинговер [Alberts et al., 1994. P. 264].

Участок сочленения может иметь длину в несколько тысяч нуклеотидов

стадию, на которой становятся видимыми индивидуальные хромосомы. В каждой из этих хромосом ДНК уже реплицирована и содержит две сестринские хроматиды, состоящие из дуплексной ДНК. Гомологичные хромосомы притягиваются друг к другу, конъюгируют в одном или более районе, формируя биваленты. Когда процесс спаривания хромосом завершен, хромосомы соединяются латерально за счет структуры, называемой синаптонемальным комплексом.

Рекомбинация между хромосомами подразумевает физический обмен частями, происходящий по принципу «разрыв и воссоединение», в ходе которых две несестринские хроматиды рвутся и затем воссоединяются. Когда хромосомы начинают расходиться, их контакты между собой остаются в виде так называемых хиазм.

Традиционно считается, что хиазмы представляют собой отражение существования кроссинговера, хотя формальных доказательств этой связи до сих пор не получено.

У прокариот известны ферменты, вовлеченные в каждый этап рекомбинации, и кодирующие их гены, имеющие название *rec*. Мутации этих генов фенотипически проявляются в неспособности к рекомбинации. Идентифицировано 10–20 таких генов [Lewin, 2000].

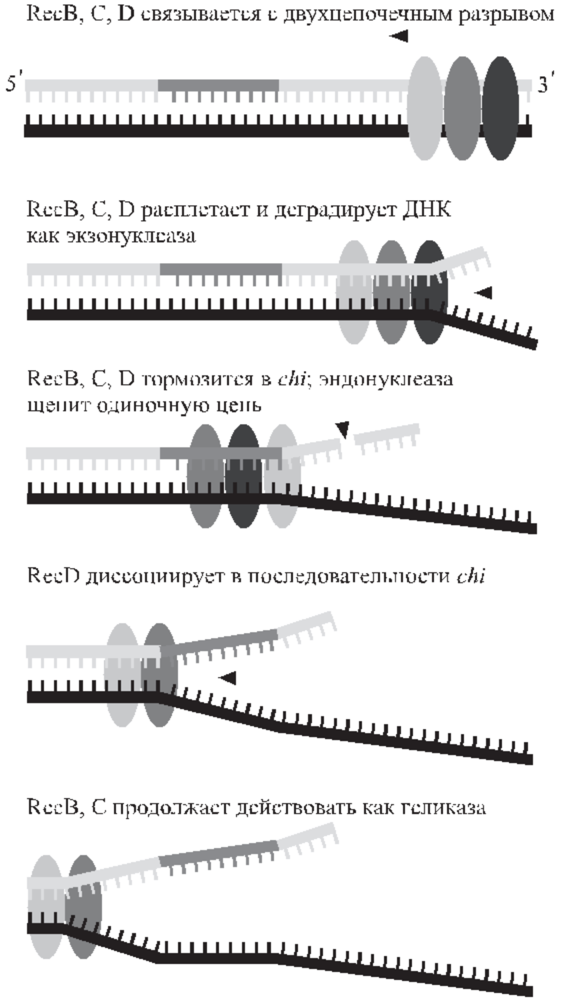
По-видимому, первым шагом к началу рекомбинации ДНК является сближение двух дуплексных молекул ДНК.

Для обмена между дуплексами ДНК необходимо образование по крайней мере двух брешей — ников. В механизме общей рекомбинации скоординированное образование этих ников и запечатывание разрывов возможно только тогда, когда две спирали ДНК имеют обширные районы гомологии. Для того чтобы получить структуру, изображенную на рис. 8.18, необходимо, чтобы в каждой из четырех цепей образовалась брешь с последующим лигированием.

Существует много доказательств того, что даже единственной бреши только в одной цепи молекулы ДНК достаточно для инициации общей рекомбинации. Химические препараты или облучение, приводящие к образованию однонитчатых ников, будут стимулировать рекомбинацию.

У мутантов фага λ существуют особые участки ДНК (*chi*), способствующие инициации рекомбинации: мотивы нуклеотидов длиной по 8 пн, которые сами по себе рекомбинацию не вызывают, но необходимы для нее. Они стимулируют рекомбинацию в ДНК по соседству, на расстоянии до 10 тпн. Процесс активируется в результате возникновения двухцепочечного разрыва в нескольких тысячах пар нуклеотидов от *chi*, причем в определенной ориентации. Сайты *chi* являются мишенями для действия комплекса ферментов, кодируемых генами *E. coli recB, C, D* (рис. 8.19). Вначале белки RecB, C, D связываются с двунитчатым разрывом в ДНК, затем перемещаются, расплетая ДНК и деградируя 3'-конец цепи. Когда комплекс достигает локуса *chi*, он тормозится и расщепляет одну из цепей в этом локусе, после чего теряет белок D. Комплекс вследствие этого утрачивает нуклеазную активность. В результате действия RecB, C, D возникает свободный конец ДНК («усик»), что инициирует формирование участков сочленения гетеродуплексов. На рис. 8.20 показано, как «усик» может инициировать взаимодействие между двумя комплементарными нитями ДНК. Процесс, однако, более сложен. Для того чтобы цепь из одной гетеродуплексной молекулы смогла внедриться в другую, у *E.coli* функционирует белок RecA, кодируемый геном *recA*. Белок RecA в виде больших кооперативных кластеров плотно связывается с однонитчатой ДНК, образуя нуклеопротеиновый филамент. В нем имеется несколько сайтов связывания с ДНК, поэтому есть возможность держать одиночную и двойную цепи ДНК вместе. Эти

Рисунок 8.19



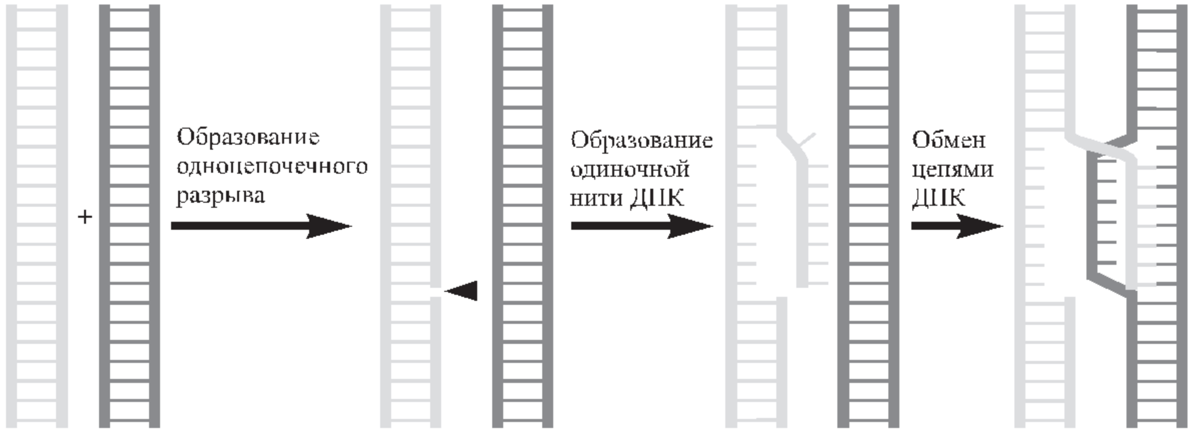
Действие белкового комплекса RecB, C, D [Lewin, 2000. P. 427]
Объяснения в тексте

сайты позволяют белку RecA катализировать многоступенчатую реакцию (называемую синапсисом) между двухцепочечной молекулой ДНК и гомологичными районами одноцепочечной.

Первым шагом в синапсисе является спаривание комплементарных последовательностей нуклеотидов. В результате образуется трехцепочечная структура. После этого короткий гетеродуплексный участок, в котором нити из двух различных молекул начинали спариваться, увеличивается из-за «миграции ветви» (рис. 8.21). «Миграция ветви» может происходить в любой точке, где две одиночные цепи ДНК, имеющие одинаковые последовательности, конкурируют за возможность спариваться с одной и той же комплементарной цепью. Неспаренный участок одной из одиночных цепей заменяется спаренным районом другой, двигая точку ветвления. Спонтанное движение ветви равновероятно в любом направлении (рис. 8.21, *а*). Поскольку белок RecA катализирует однонаправленное движение ветви, это создает район гетеродуплекса длиной в несколько тысяч пар оснований (рис. 8.21, *б*).

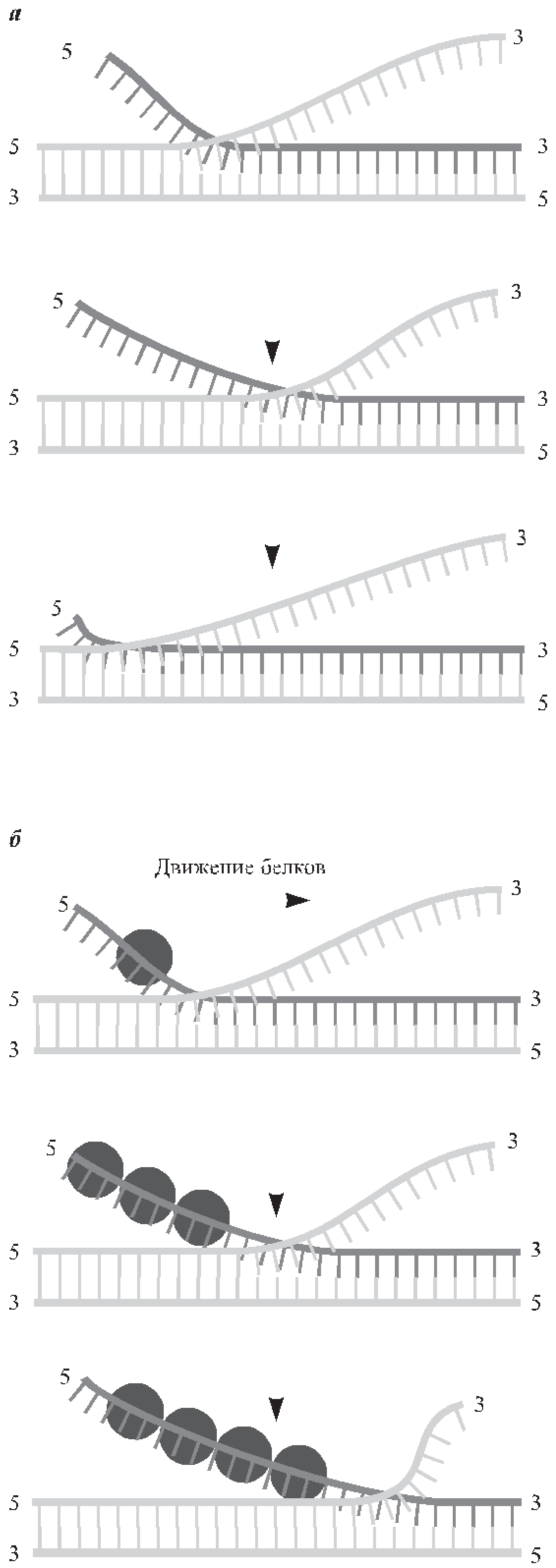
После этого у большинства изученных организмов наступает стадия формирования перекрестного обмена цепей, или структур Холлидея (рис. 8.22). В этих структурах две гомологичные молекулы ДНК, которые раньше были спарены, теперь удерживаются вместе за счет сформировавшихся обменов между двумя из четырех цепей: по одной из каждой молекулы ДНК. Структура Холлидея имеет две особенности: 1) точка обмена между цепями может быстро мигрировать вперед и назад; 2) она состоит из двух пар цепей — одна пара пересекающихся и одна пара непересекающихся.

Рисунок 8.20



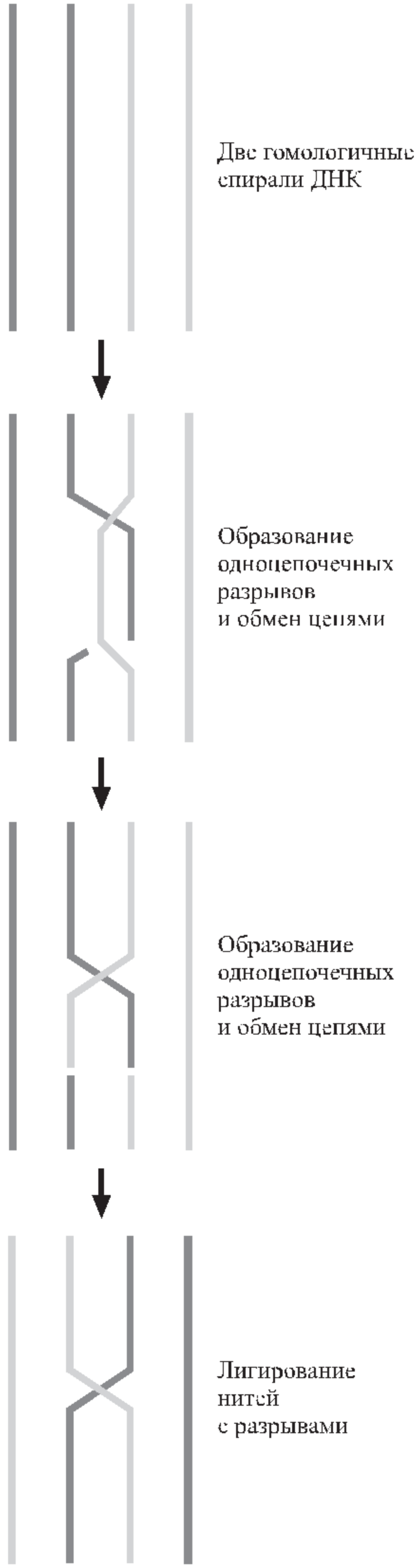
Первоначальный обмен нитями в схеме общей рекомбинации [Alberts et al., 1994. P. 265]

Рисунок 8.21



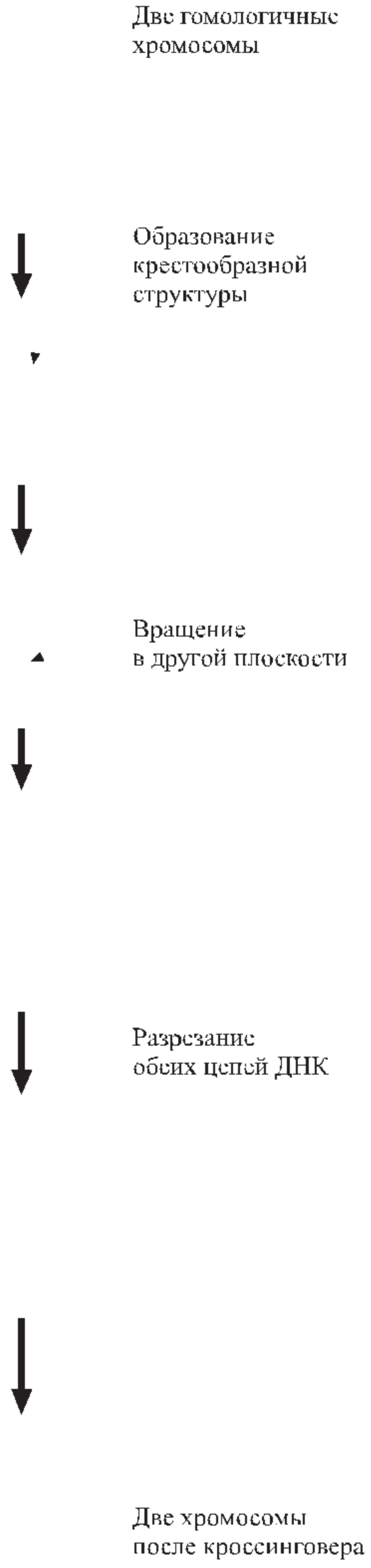
Два типа миграции ветви, наблюдаемые в экспериментах *in vitro* [Alberts et al., 1994. P. 267]: *а* — спонтанная миграция вперед и назад; *б* — однонаправленная миграция, контролируемая белками

Рисунок 8.22



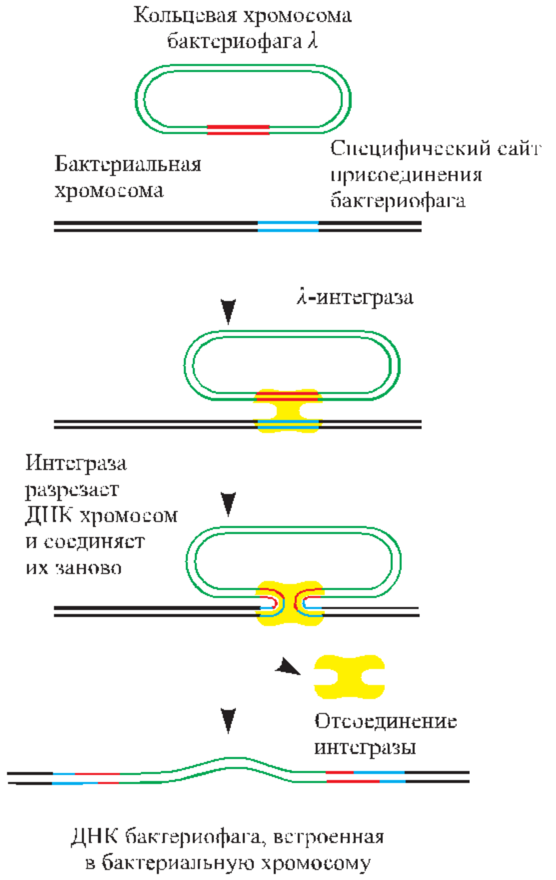
Перекрестный обмен цепей ДНК (структуры Холлидея) [Alberts et al., 1994. P. 268]

Рисунок 8.23



Изомеризация перекрестного обмена цепей [Alberts et al., 1994. P. 269]

Рисунок 8.24



Инсерция ДНК бактериофага λ в бактериальную хромосому [Alberts et al., 1994. P. 271]

Может происходить изомеризация (рис. 8.23): после серии вращений исходно непересекающиеся молекулы становятся пересекающимися, и наоборот. Изомеризация может происходить спонтанно и под контролем клетки.

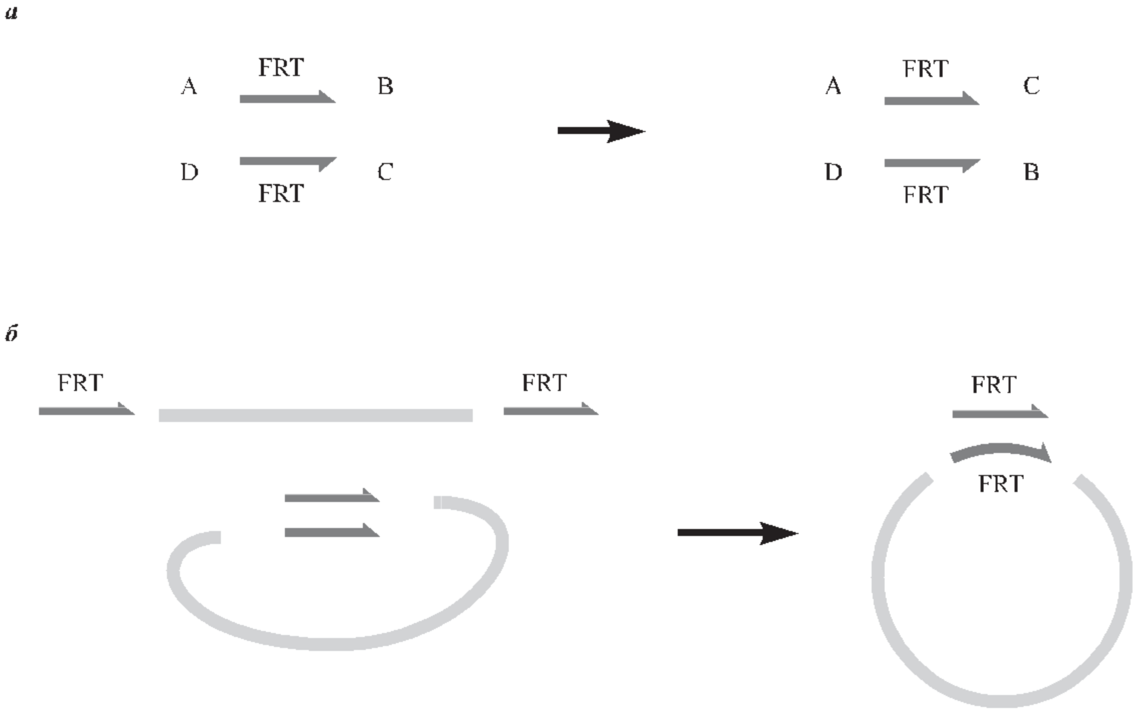
Для того чтобы восстановить две раздельные спирали ДНК и таким образом закончить процесс спаривания молекул, две пересекающиеся цепи должны быть разрезаны. Если они разрезаны до изомеризации, две исходные спирали отделяются одна от другой почти неизмененными. Если пересекающиеся нити разрезаны после изомеризации, одна секция каждой из исходных спиралей ДНК соединяется с секцией другой молекулы, другими словами, две спирали ДНК испытывают кроссинговер.

8.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация

8.3.2.1. Характеристика процесса

В отличие от общей рекомбинации, сайт-специфическая рекомбинация происходит под

Рисунок 8.25



Результаты сайт-специфической рекомбинации в плазмиде 2μ circle дрожжей [Golic, Lindquist, 1989. P. 500]:
а — рекомбинация между инвертированными, *б* — прямыми повторами FRT

контролем ферментов, опознающих специфические последовательности нуклеотидов, присутствующие на одной или двух рекомбинирующих молекулах. С помощью этого типа рекомбинации бактериальные вирусы и мобильные элементы перемещаются по геному.

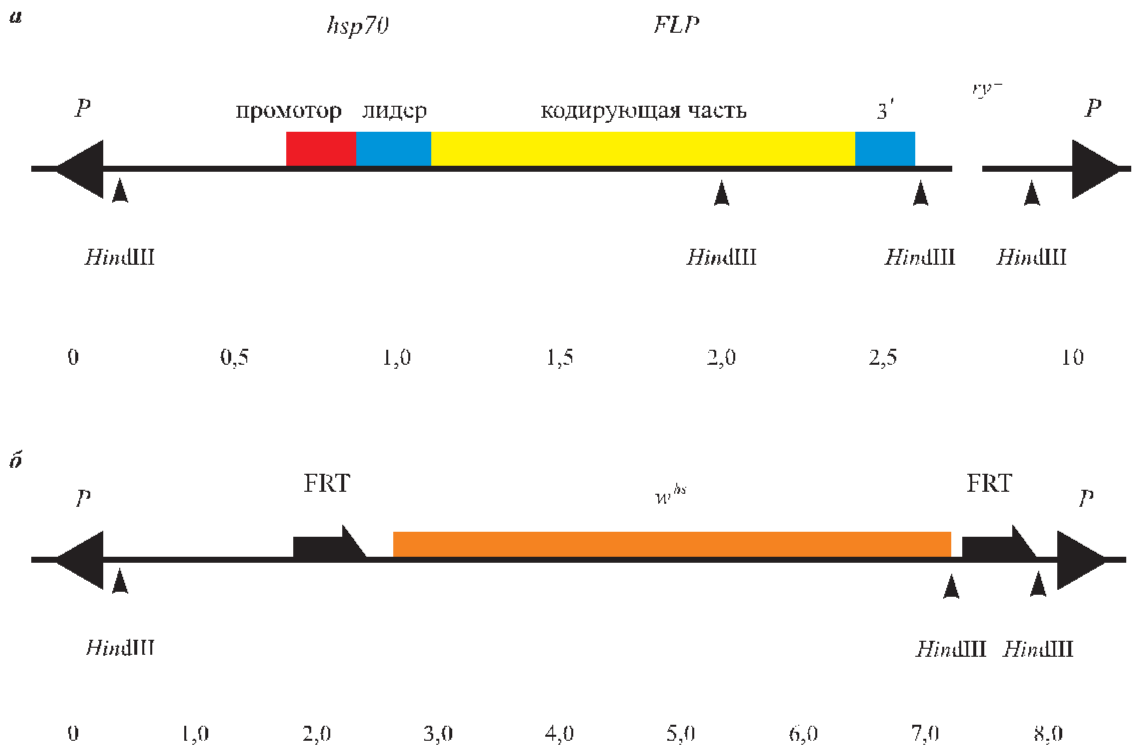
Сайт-специфическая рекомбинация была открыта в результате исследований механизма перемещения бактериофага λ по хромосоме *E.coli*. В интегрированном состоянии вирус внедрен в бактериальную хромосому и реплицируется как часть ДНК клетки-хозяина. Когда вирус проникает в клетку, на матрице вирусного гена синтезируется фермент λ-интеграза. Этот фермент и катализирует процесс рекомбинации, начинающийся тогда, когда несколько молекул белка интегразы плотно связываются со специфическими последовательностями на кольцевой хромосоме фага. Получившийся ДНК-белковый комплекс теперь связывается со сходными, но не идентичными последовательностями на бактериальной хромосоме, сближая тем самым бактериальную и фаговую хромосомы (рис. 8.24). Затем интеграза делает надрезы в молекулах ДНК, формируя маленький участок сочленения гетеродуплекса. Интеграза напоминает ДНК-топоизомеразу в том отношении, что она формирует ковалентную связь с ДНК в тех же местах, где и разрывает. Тот же самый механизм сайт-специфической рекомбинации приходит в действие, только в обратном направлении, когда фаг λ вырезается из сайта интеграции.

8.3.2.2. *Экспериментальная сайт-специфическая рекомбинация у дрозофилы*

В геноме дрожжей существует система FLP, которая содержит все необходимое (рекомбиназу) для индукции рекомбинации. Белковый продукт *FLP* воспринимается сайтами FRT (FLP recombination targets), имеющими длину около 600 пн. *FLP* располагается в 2μ circle мини-хромосоме (плазмиде). Фрагменты FRT могут находиться в любом участке генома.

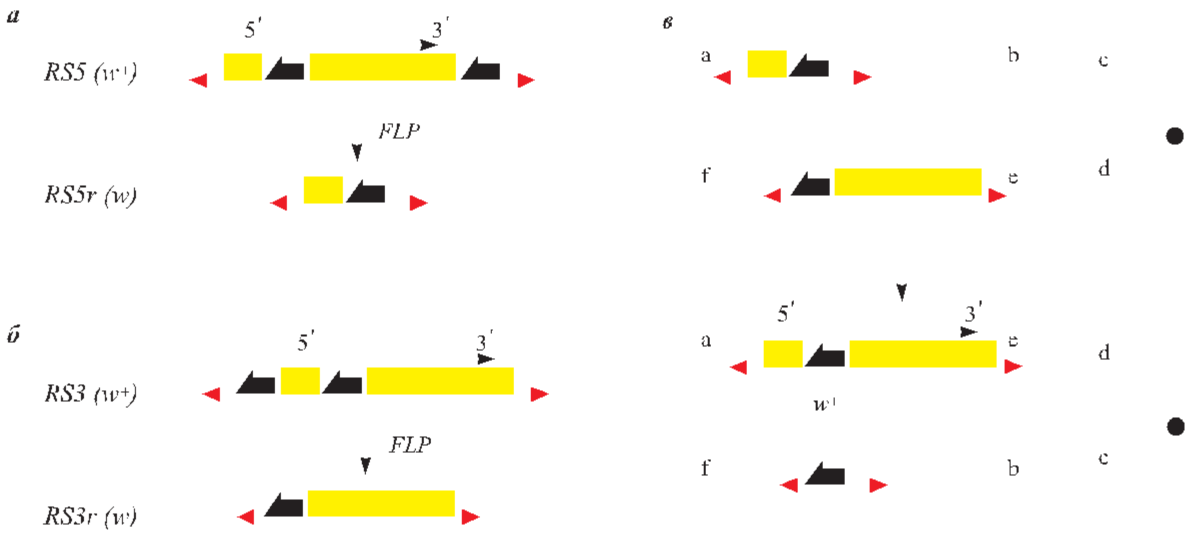
В плазмиде 2μ circle находится как ген рекомбиназы (*FLP*), так и пара FRT-районов (рис. 8.25). Этого набора генных элементов оказывается достаточно для прохождения рекомбинации. При этом если FRT-последовательности ориентированы навстречу друг другу, то в результате кроссинговера образуется

Рисунок 8.26



Конструкции, содержащие *FLP* и FRT, для трансформации дрозофилы [Golic, Lindquist, 1989]:
а — вектор *P*[*ry*$^{+}$,*hsp70*,*FLP*], *б* — *P*[FRT,*w*^{hs},FRT]

Рисунок 8.27



Получение инверсии с помощью двух противоположно ориентированных FRT-районов [Golic, Golic, 1996. P. 1695]:
а — получение линий с *RS5r*, *б* — *RS3r*-элементами в хромосомах;
в — использование этих элементов для получения инверсии.
Черный кружок — центромера; желтые участки — части гена *white*; мРНК нарисована над геном; черные полустрелки — FRT; маленькие красные стрелки — концевые участки *P*-элемента;
w^{+} или *w* — получаемые фенотипы мух

Рисунок 8.28

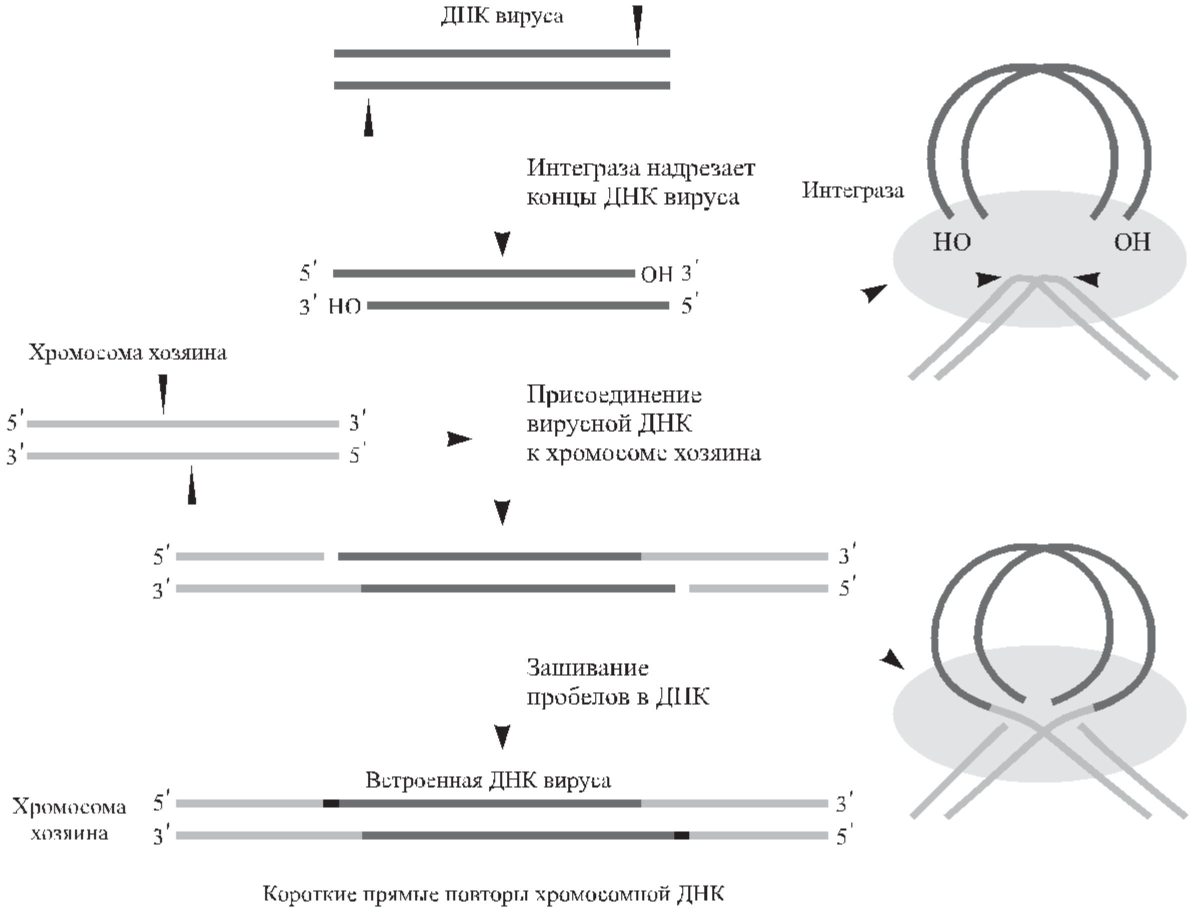


Схема случайной рекомбинации [Alberts et al., 1994. P. 273]

инверсия, если же FRT расположены как прямой повтор, получаются делеция и дупликация.

Всю систему можно ввести в геном дрозофилы с помощью трансформации. Для этого создают две конструкции: в одной *FLP* помещают под контроль промотора генов теплового шока, благодаря чему рекомбинацию можно индуцировать, в другой конструкции между FRT располагают ген *white*, по делеции или дупликации которого можно судить о происшедшей рекомбинации (рис. 8.26).

Очевидно, что, если поместить FRT-последовательности в *P*-элемент, заставить его перемещаться по геному, можно получить огромное количество линий с инсерциями *P*-элемента, а следовательно, и FRT-участков, в самые разнообразные участки генома дрозофилы. Затем, отбирая пары линий с известной локализацией *P*-элементов, можно направленно получать делеции, дупликации и инверсии между выбранными районами хромосом (см. рис. 8.25, 8.27).

8.3.3. Случайная рекомбинация

Многие мобильные последовательности ДНК, включая вирусы и мобильные элементы, кодируют интегразы (или, по-другому, транспозазы), которые позволяют их ДНК встраиваться в хромосомы с помощью механизма, отличного от того, который используется бактериофагом λ. Так же, как и λ-интеграза, каждый из этих ферментов опознает специфические последовательности ДНК в соответствующем мобильном элементе, чья рекомбинация катализируется. В отличие от интегразы фага λ, эти интегразы не требуют специфических последовательностей ДНК в хромосоме-мишени и не формируют сочленения гетеродуплекса. Вместо этого они образуют надрезы с обоих концов линейной последовательности мобильного элемента и затем катализируют взаимодействие этих концов ДНК с ДНК-мишенью, разрывая в ней фосфодиэфирные связи. В результате в рекомбинантной молекуле ДНК образуются две короткие однонитчатые бреши,

по одной на каждом конце мобильного элемента. Они заполняются ДНК-полимеразой для завершения процесса рекомбинации (рис. 8.28). В соответствии с этим механизмом образуются короткие дупликации в ДНК клетки-хозяина, прилежащей к месту инсерции. Такие фланкирующие дупликации являются отличительной чертой случайной, или транспозиционной, сайт-специфической рекомбинации.

Фермент интеграза этого типа впервые был выделен в активной форме из бактериофага Mu.

Литература к разделу 8.3

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 144–168.

Кушев В. В. Механизмы генетической рекомбинации. Л.: Наука, 1971. 247 с.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир. В 2 т. Т. 1. 1998. С. 103–111.

Смирнов В. Г. Цитогенетика. М.: Высш. шк., 1991. С. 42–107.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 264–268.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989. P. 1047–1048.

Carpenter A. T. C. Gene conversion, recombination nodules, and the initiation of meotic synapsis // BioEssays. 1988. Vol. 6. P. 232–236.

Golic K. G., Golic M. M. Engeneering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design // Genetics. 1996. Vol. 144. P. 1693–1711.

Golic K. G., Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome // Cell. 1989. Vol. 59. P. 499–509.

Klein H. L. Genetic control of intrachromosomal recombination // BioEssays. 1995. Vol. 17. P. 147–159.

Lewin B. Genes. 5th ed. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 426, 967–975.

Sybenga J. Recombination and chiasmata: few but intriguing discrepancies // Genome. 1996. Vol. 39. P. 473–484.

8.4. ГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ

Иногда в результате мейоза получаются три копии материнского аллеля и только одна копия отцовского, что свидетельствует об изменении одной копии отцовского аллеля в материнский. Это явление называется генной конверсией. Оно часто происходит в связи с событиями общей рекомбинации и репарации ДНК.

Как уже отмечалось, в ходе мейоза образуется сочленение гетеродуплекса в участках

Рисунок 8.29

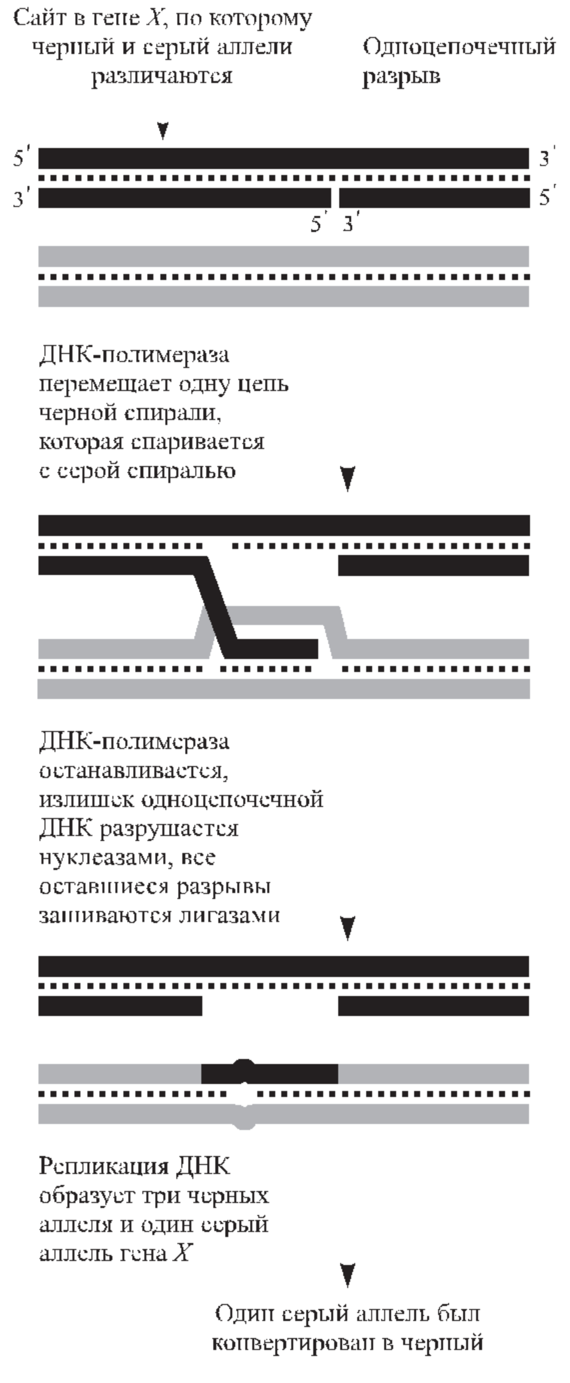


Схема генной конверсии [Alberts et al., 1994. P. 269].

Процесс начинается с образования ника на одной из цепей ДНК. На первом этапе ДНК-полимераза начинает синтез дополнительной копии цепи в черной спирали, заменяя оригинальную копию. Эта одиночная цепь затем спаривается с гомологичным районом серой цепи. Затем короткий район неспаренной серой цепи, продуцированной на предыдущем этапе, деградирует, завершая перенос нуклеотидных последовательностей. Результат обычно виден в следующем клеточном цикле, после того как репликация ДНК разделяет две некомплементирующие цепи

кроссинговера между гомологичными материнской и отцовской хромосомами. Если эти участки хромосом несколько различаются, в районе сочленения могут произойти нарушения спаривания нуклеотидов (mismatch). Эти нарушения будут исправляться системой репарации ДНК. Следствием этого будет генная конверсия. Генная конверсия может также произойти по ряду других механизмов, но все они требуют осуществления какого-то варианта общей рекомбинации, по которому две гомологичные молекулы ДНК располагаются вместе. Поскольку производятся дополнительные копии фрагментов ДНК, процесс конверсии сопровождается ограниченным синтезом ДНК. Опыт показывает, что обычно только малые участки ДНК испытывают генную конверсию и в большинстве случаев изменяется лишь часть гена.

Генная конверсия может происходить в митотических клетках, но значительно реже. Один из весьма вероятных механизмов генной конверсии как в мейотических, так и в митотических клетках показан на рис. 8.29.

Литература к разделу 8.4

Глазер В. М. Конверсия гена // Соросовский образовательный журн. 2000. № 6. С. 23–31.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 268–270.

Глава 9
СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ХРОМОСОМ

9.1. ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Хромосомы — это нуклеопротеиновые тела, в которых хранится, передается потомству и реализуется наследственная информация.

И. Д. Чистяков в 1874 г. описал ряд стадий митоза в спорах плаунов, показав таким образом наличие хромосом. Хромосомы были описаны Э. Страсбургером в детальных исследованиях митоза у растений в 1875–1879 гг. и В. Флеммингом в 1879 г. — у животных. В. Флемминг в 1878 г. нашел в ооцитах аксолотля «странные тонкие структуры», рисунок которых был опубликован в 1882 г. Впоследствии эти «структуры» были названы хромосомами типа «ламповых щеток». В 1881 г. Э. Бальбиани описал в клетках слюнных желез хирономуса поперечно исчерченные ленты. Их назвали «структурами Бальбиани». Только в 1912 г. чешский ученый Ф. Рамбоусек предположил, что это специализированные хромосомы. А окончательно название «политенные хромосомы» утвердилось в 1935 г.

Свое название хромосомы получили благодаря способности интенсивно окрашиваться основными красителями. Сам термин «хромосома» был предложен лишь в 1888 г. В. Вальдейером (W. Waldeyer).

Огромное значение факта продольного расщепления каждой хромосомы — образования хроматиды — в процессе деления клетки отметил в тот же период В. Ру (W. Roux, 1883). С удивительной интуицией он указал, что подобный способ деления хромосом свидетельствует о присутствии в них жизненно важных для клетки элементов и о расположении этих элементов в линейном порядке.

А. Вейсман предположил, что наследственная информация сосредоточена в хромосомах, а доказали это Т. Морган, К. Бриджес, Г. Мёллер и А. Стёртевант, завершившие к середине 1930-х гг. разработку хромосомной теории наследственности.

В настоящее время наиболее известны два типа хромосом:

1) у прокариот в нуклеоиде и в клеточных органеллах у эукариот;

2) хромосомы клеток эукариот, имеющие разную морфологию в митозе и интерфазе.

Литература к разделу 9.1

Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. М.: Мир, 1981. 598 с.

Кольцов Н. К. Наследственные молекулы // Наука и жизнь. 1935. Вып. 5, 6. Организация клетки. М.; Л.: Гос. изд-во биол. и мед. лит., 1936. С. 585–586.

Прокофьева-Бельговская А. А. Строение и функция хромосом: Руководство по цитологии. В 2 т. Т. 2. М.; Л.: Наука, 1966. С. 280–329.

Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.

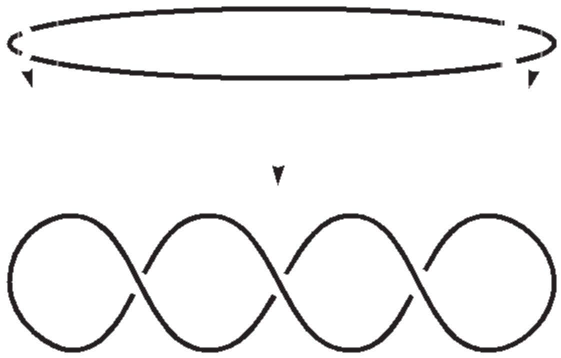
9.2. ХРОМОСОМЫ ВИРУСОВ, ПРОКАРИОТ И КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ ЭУКАРИОТ

У ДНК-содержащих вирусов, бактерий, сине-зеленых водорослей, а также в самореплицирующихся органеллах клеток эукариот (пластидах и митохондриях) хромосома представляет собой двуспиральную молекулу ДНК. У большинства форм эта молекула образует кольцо, которое закручено в шпильку, и хромосома сверхспирализована (рис. 9.1). У бактерий геном организован в некое тело или тела, которые выглядят довольно компактными и за-

Таблица 9.1. Размеры кольцевой молекулы ДНК

Источник ДНК	Длина	
	мкм	тпн
Мелкие вирусы	0,4–1,0	1,2–3
Другие вирусы, пластиды, митохондрии	5–600	15–2000
Бактерии	150–2000	500–6000

Рисунок 9.1



Кольцевая форма и сверхспирализация молекулы ДНК у бактерий

нимают около трети объема клетки. Эти тела называют нуклеоидами.

Репликация хромосом начинается с единственной определенной точки (точки инициации репликации) и прогрессирует, пока не закончится репликация всей хромосомы. Таким образом, хромосома представляет собой единицу репликации — репликон. В большинстве случаев, а у бактерий — всегда, репликация хромосомы идет одновременно в обе стороны (рис. 9.2).

Репликация хромосом вирусов и прокариот протекает быстро, со скоростью порядка 30 мкм в минуту. У прокариот хромосома прикреплена к клеточной мембране. Имеются фиксированные точки прикрепления нуклеоида к мембране — это точка начала репликации (*oriC*) и точка завершения репликации (*terC*).

Длина молекул ДНК, служащих хромосомами у вирусов, прокариот и клеточных органелл, варьирует (табл. 9.1).

9.2.1. Геном бактерий

В результате полного секвенирования геномов некоторых бактерий размер кольцевых молекул ДНК и число генов определены: у *Bacillus subtilis* длина ДНК составляет 4214,814 тпн и геном содержит около 4100–4220 генов, у *E. coli* — 4639,221 тпн и примерно 4290 генов (рис. 9.3).

Наследственный аппарат бактерии — нуклеоид — аналогичен ядру эукариот. Это область бактериальной клетки — образование, состоящее из ДНК, белков и РНК. Нуклеоид выглядит как бобовидное тело с хорошо очерченными контурами, занимающее центральную часть бактериальной клетки и имеющее длину (у кишечной группы бактерий) около 1 мкм; ядерной оболочки вокруг него не найдено.

Рисунок 9.2

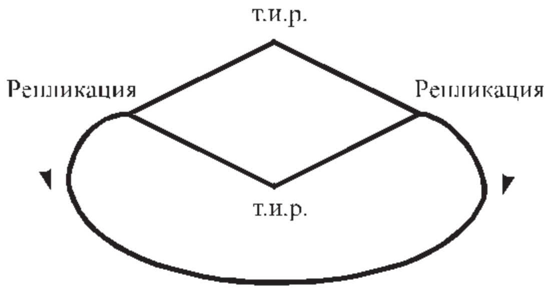
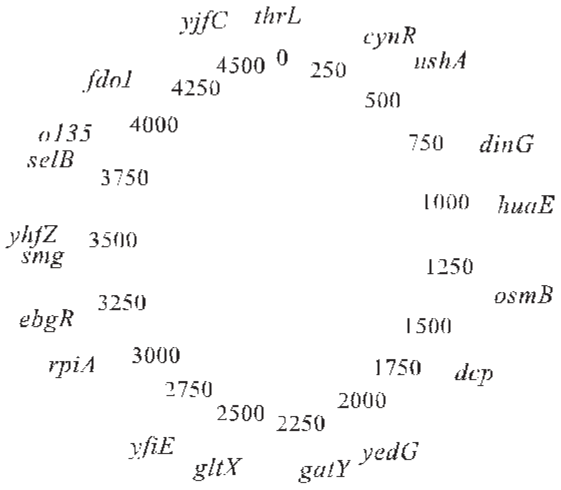


Схема репликации кольцевой ДНК.
т.и.р. — точка инициации репликации

Рисунок 9.3



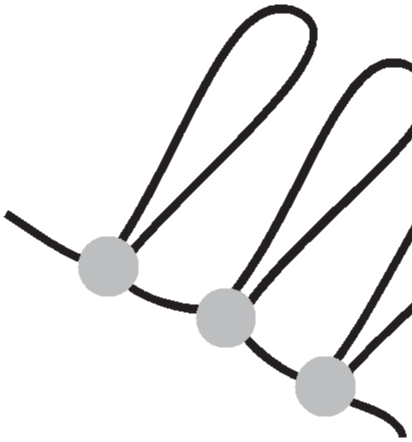
Сопоставление генетической карты и длины кольцевой молекулы ДНК (в тпн) у *E. coli*

Нуклеоиды прикреплены к цитоплазматической мембране: имеются фиксированные точки прикрепления, например, точка начала репликации (*oriC*) и точка завершения репликации (*terC*). Кроме того, по-видимому, есть «скользящие участки», в частности, тот участок, в котором в данный момент идет репликация, а также большое число «неспецифических» точек контакта с мембраной.

После удвоения происходит расхождение дочерних нуклеоидов к полюсам клетки, деление клетки и образование новой клеточной оболочки.

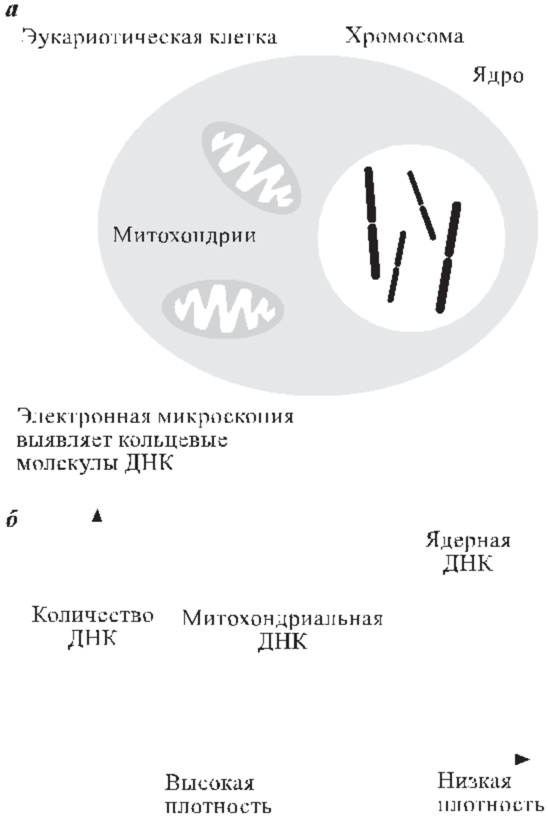
О том, каким образом нуклеоиды расходятся к полюсам клетки, исследователи спорят до сих пор. Вначале, в 1940–1950-х гг., полагали, что существует какой-то механизм, подобно кариокинезу у эукариот. Затем стала общепризнанной точка зрения, согласно которой

Рисунок 9.4



Петлевая организация ДНК у бактерий

Рисунок 9.5



Локализация в клетке (*а*) и характеристика (*б*) ядерной и цитоплазматической ДНК [Russell, 1998. P. 681]

разделение нуклеоидов является пассивным процессом: межклеточная перегородка, врастая между нуклеоидами, разделяет их между дочерними клетками.

В последние годы доминирует представление о существовании белкового комплекса, «растаскивающего» нуклеоиды к полюсам клетки [Прозоров, 1998]. ДНК в бактериальном нуклеоиде находится в ассоциации как минимум с 5 белками: HU, INF, H1, HLP, H. Эти белки похожи по аминокислотному составу и другим свойствам на гистоны эукариот. Они имеют небольшие размеры — 9–28 кДа, и по большей части это белки основные. Видимо, они очень консервативны: у бактерий кишечной группы и цианобактерий, дивергировавших 2–3 млрд лет назад, HU-белки обладают перекрестной антигенной специфичностью. На клетку *E.coli* приходится около 30 тыс. димерных молекул белка HU и 120 тыс. мономерных молекул белка H.

Белок HU конденсирует ДНК, возможно, заворачивая ее в бусоподобные структуры, напоминающие нуклеосомы. Он стимулирует репликацию ДНК. Однако 30 тыс. димеров этого белка, находящихся в клетке *E.coli,* хватит на «упаковку» только 1/6 ДНК нуклеоида [Прозоров, 1998].

Белок H1 связывается с ДНК, взаимодействуя прежде всего с теми последовательностями, которые изогнуты. Функции белка неизвестны.

Белок P был секвенирован, и по последовательности аминокислот он напоминает протамины, которые связываются с ДНК в сперматозоидах некоторых видов. Предполагается, что P — это связывающийся с ДНК белок, однако функции его также неизвестны.

Белок INF, возможно, принимает участие в формировании доменной структуры нуклеоида.

ДНК в нуклеоиде составляет около 80 % (для сравнения: в ядре у эукариот — только 50 %). Она свернута в петли, примерно по 40 тпн в каждой петле (рис. 9.4). Основания петель защищены с помощью какого-то неизвестного механизма, что предотвращает передачу вращения ДНК с одной петли на другую. В геноме примерно 100 таких петель, или доменов.

9.2.2. Геном митохондрий

Митохондрии — органеллы клетки, ответственные за продукцию ATP путем окислительного фосфорилирования (ОФ). Внутренняя мембрана митохондрий образует кристы, на которых располагаются пять ферментных комплексов, формирующих аппарат ОФ для производства и накопления энергии. Комплексы I–IV образуют единую цепь, которая служит для передачи электронов, тогда как комп-

Рисунок 9.6

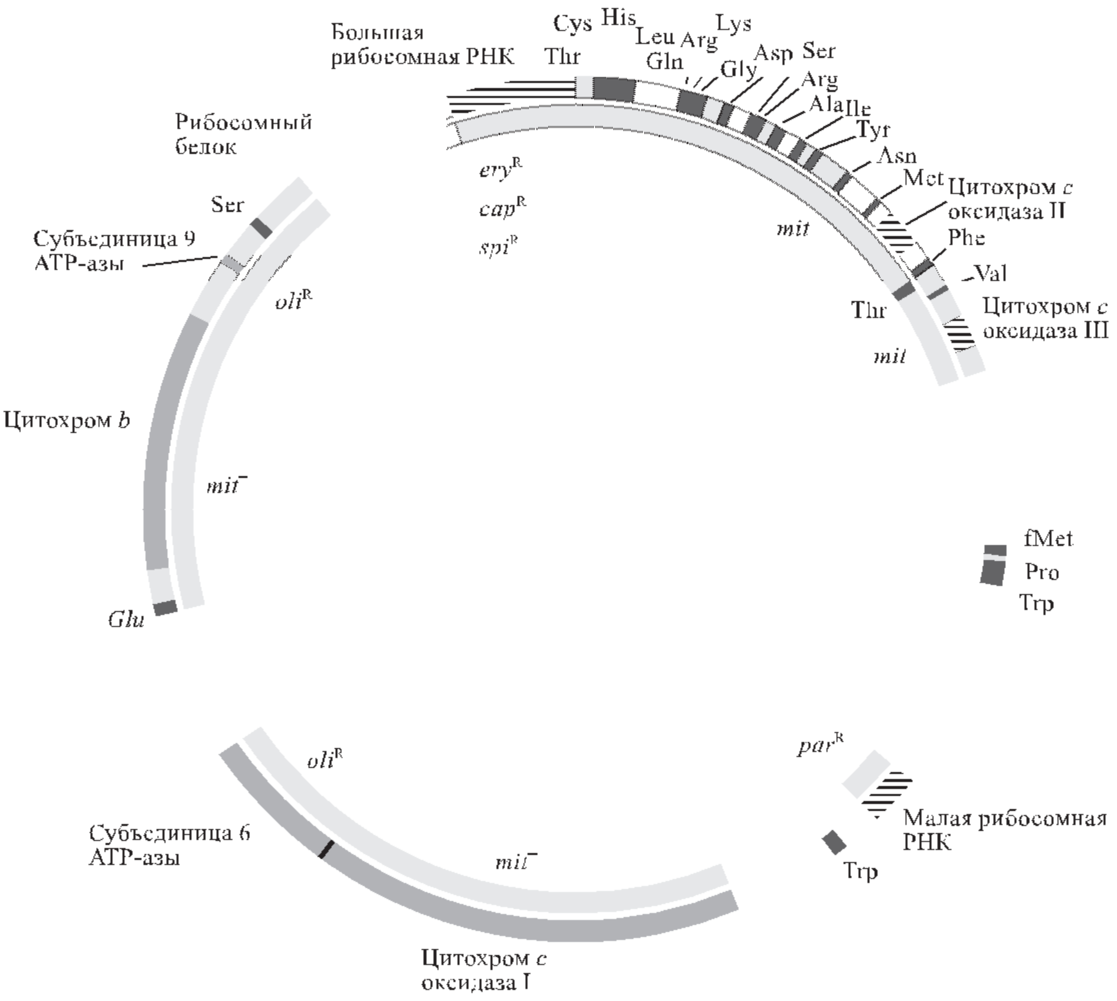


Рис. 9.6. Карта митохондриальной ДНК дрожжей.
В мтДНК расположены гены, необходимые для трансляции в митохондриях (главным образом рРНК и тРНК), а также гены, кодирующие субъединицы белков, связанных с продукцией АТР

лекс V содержит АТР-синтетазу. Большинство полипептидов, участвующих в процессе ОФ, а их более 70, кодируется ядерной ДНК. После сборки на 80S рибосомах они транспортируются в митохондрии. Небольшое число полипептидов (около 10), без участия которых процесс ОФ невозможен, кодируется митохондриальным геномом. Почти все компоненты транспортных РНК (22 типа тРНК), участвующих в синтезе белка *in situ*, являются продуктом самих митохондрий. Кроме этого митохондриальная (мтДНК) кодирует два типа рРНК.

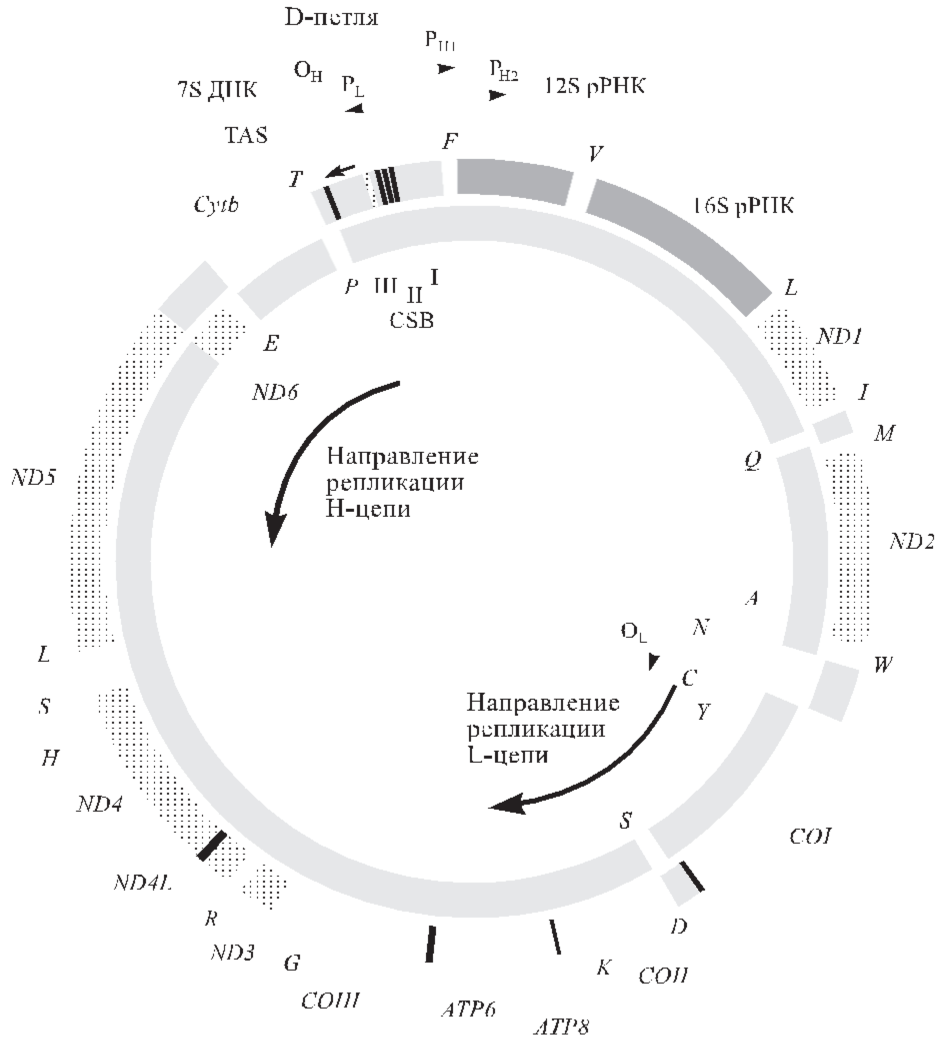
ДНК в митохондриях двуспиральная, кольцевая, суперскрученная и очень часто более тяжелая за счет большего содержания G–C-пар (рис. 9.5).

У животных размер мтДНК обычно менее 20 тпн: у человека — 16 569 пн, у ксенопуса и дрозофилы — 18 400 пн. У дрожжей размер мтДНК существенно больше — около 80 тпн, а у растений еще больше — 100–2000 тпн. Молекулярно-генетическая карта ДНК митохондрий дрожжей показана на рис. 9.6.

В пределах митохондрии есть нуклеоиды, аналогичные таковым в бактериальных клетках, каждый из которых содержит по нескольку копий мтДНК: например, в клетках дрожжей каждая митохондрия имеет 10–30 нуклеоидов, и в каждом находится 4–5 молекул ДНК. Поскольку у дрожжей в одной клетке содержится от 1 до 45 митохондрий, в ней может быть 40–6750 молекул, или между 3200 и 540 000 тпн, митохондриальной ДНК, что существенно больше геномного количества ДНК (17 500 тпн).

Митохондриальная ДНК человека представляет собой замкнутую двухцепочечную

Рисунок 9.7



Функционально-генетическая карта мтДНК человека.

Митохондриальный геном человека состоит из 16 569 пн и включает следующие элементы:

D-петля — это район мтДНК размером 1122 пн (позиции 16024–576), отвечающий за процессы репликации и транскрипции. Он содержит TAS — последовательность, ассоциированную с терминацией (16157–16172), $O_н$ — точку инициации репликации тяжелой цепи (110–441), последовательности консервативных блоков CSBI (213–235), CSBII (299–215) и CSBIII (346–363), сайты связывания транскрипционного фактора mtTF (233–260, 276–303, 418–445, 523–550), митохондриальный праймер репликации (317–321), P_L — промотор легкой цепи (392–445), P_{H1} — главный (545–567) и P_{H2} — минорный (~654 пн) промоторы тяжелой цепи.

Сайт прикрепления к мембране локализован приблизительно в районе 15925–499. Другие регуляторные последовательности расположены вне района D-петли и включают в себя O_L — точку инициации репликации легкой цепи (5721–5798) и терминатор транскрипции, регулирующий соотношение рРНК : мРНК (3237–3249).

2 гена рибосомальных РНК: 12S (648–1601); 16S (1671–3229).

22 гена транспортных РНК (показаны горизонтальной штриховкой): *A* — аланин (5587–5655), *R* — аргинин (10405–10469), *N* — аспарагин (5657–5729), *D* — аспартат (7518–7585), *C* — цистеин (5761–5826), *E* — глютамат (14674–14742), *Q* — глютамин (4329–4400), *G* — глицин (9991–10058), *H* — гистидин (12138–12206), *I* — изолейцин (4263–4331), *L* — лейцин (3230–3304 и 12266–12336), *K* — лизин (8295–8364), *M* — метионин (4402–4469), *F* — фенилаланин (577–647), *P* — пролин (15955–16023), *S* — серин (7445–7516 и 12207–12265), *T* — треонин (1588–15953), *W* — триптофан (5512–5576), *Y* — тирозин (5826–5891), *V* — валин (1602–1670).

13 генов, кодирующих субъединицы ОФ: гены полипептидов комплекса I (NADH-дегидрогеназа) — *ND1* (3307–4462), *ND2* (4470–5511), *ND3* (10059–10404), *ND4* (10760–12137), *ND4L* (10470–10766), *ND5* (12337–14148), *ND6* (14149–14673); ген полипептида комплекса III (цитохром b) — *Cytb* (14747–15887); гены полипептидов комплекса IV (цитохром оксидаза C) — *COI* (5904–744), *COII* (7586–8262), *COIII* (9207–9990); гены полипептидов комплекса V (АТР-аза) — *ATP6* (8527–9207), *ATP8* (8366–8572).

Позиции на карте мтДНК указаны в соответствии с конвенцией Human Gene Mapping (HGM) [Wallace et al., 1992]

спираль из 16 569 пн (рис. 9.7). Цепи имеют асимметрическое распределение нуклеотидов G и C, причем гуанин-богатая тяжелая цепь (H) — это главная кодирующая цепь, содержащая гены рРНК, большинства мРНК и тРНК, в то время как цитозин-богатая легкая цепь (L) включает лишь один структурный ген (*ND6*) и 8 из 22 генов тРНК. В общей сложности 37 митохондриальных генов (13 генов ОФ, 2 гена рРНК и 22 гена тРНК) участвуют в синтезе семи белковых субъединиц комплекса I, одной субъединицы комплекса III, трех субъединиц комплекса IV и двух — комплекса V.

Интересно, что митохондриальный геном млекопитающих по своей структуре обнаруживает большее сходство с геномом прокариот, нежели с геномом эукариот: митохондриальные гены лишены интронов и транскрибируются с двух промоторов в виде полицистронных информационных РНК. Гены тРНК располагаются между структурными генами, отделяя их друг от друга. Первичные транскрипты вырезаются нуклеазами по границам тРНК. К минимуму сведен и набор тРНК, который необходим для ядерного генома — 22 гена в митохондриях, 32 — в ядре.

Репликация, транскрипция и трансляция. Первые два процесса начинаются в контрольном районе (КР), который состоит из 1122 пн (16024–576) (см. рис. 9.7). В этом районе сконцентрировано большинство регуляторных последовательностей. В то же время КР — основной некодирующий участок молекулы (лишь 87 пн располагаются в других межцистронных районах мтДНК). КР включает D-петлю — трехцепочечный район, образуемый в ходе репликации H-цепи путем синтеза ее короткого сегмента — 7S ДНК, спаренного с родительской цепью.

Данные по секвенированию индивидуальных мтДНК из разных популяций человека выявили высокую степень вариабельности контрольного района: вариабельные позиции сосредоточены в основном на его 5'- и 3'-концах. Гипервариабельные сегменты ГВС-I (16000–16400) и ГВС-II (70–380) составляют в нем примерно 710 пн.

Репликация H-цепи мтДНК начинается с синтеза 7S ДНК. Пройдя 2/3 генома вдоль L-цепи, репликация достигает точки инициации репликации легкой цепи (O_L), расположенной в кластере из пяти генов тРНК. Синтез L-цепи инициируется специфической праймазой и продолжается в обратном направлении вдоль матрицы H-цепи. Разнонаправленность и асинхронность — отличительные особенности процесса репликации, свойственные только митохондриальному геному.

Транскрипция митохондриального генома человека также имеет свои особенности. Каждая цепь считывается, начиная с соответствующего промотора P_L или P_{H1}, расположенного в контрольном районе. Синтез первичных матричных транскриптов РНК происходит в обоих направлениях. В процессе инициации транскрипции задействован транскрибирующий фактор (mtTF1), который важен и для репликации мтДНК. Специфическая мтРНК-полимераза, двигаясь вдоль расплетенной цепи, образует полицистронную мРНК. В дальнейшем специфическая эндонуклеаза разрезает полицистронную РНК, высвобождая рибосомальные, транспортные и матричные РНК. Стоит отметить, что мРНК не кэпируются, но полиаденилируются.

Трансляция митохондриальной мРНК происходит на 55S рибосомах митохондрий, каждая из которых состоит из одной большой (39S) и одной малой (28S) субъединиц. Эти рибосомы содержат меньшее количество рРНК, чем бактериальные или эукариотические рибосомы, но у них больше рибосомальных белков. Известно, что рибосомы митохондрий чувствительны к хлорамфениколу — ингибитору рибосом бактерий. Однако, в отличие от цитоплазматических 80S рибосом, они оказались устойчивы к циклогексимиду и эметину. Структура тРНК митохондрий также имеет ряд особенностей. Митохондриальные мРНК не содержат последовательность Шайна–Дальгарно; по-видимому, трансляция инициируется путем связывания малой рибосомальной субъединицы со специфичным районом мРНК, состоящим из 40 пн. Предполагается, что мРНК оборачивается вокруг рибосомы и таким образом ограничивает формирование полисом.

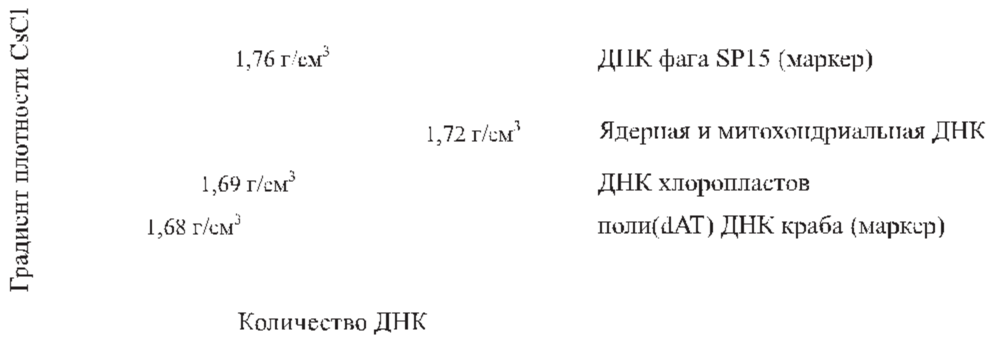
Митохондриальная ДНК млекопитающих имеет уникальный, отличный от ядерного генетический код, где UGA кодирует триптофан, AUA — метионин, AGA и AGG являются стоп-кодонами. Процесс трансляции мтДНК подчиняется модифицированному «правилу качания кодонов», в результате чего для считывания всех кодонов достаточно лишь 22 тРНК.

9.2.3. Геном хлоропластов

Во многих отношениях геномы хлоропластов и митохондрий похожи. ДНК хлоропластов (хпДНК) тоже двунитчатая, кольцевая, сверхскрученная и свободна от белков. Во многих случаях содержание G–C-пар в хлоропластах значительно отличается от найденного в ядерной и мтДНК (рис. 9.8).

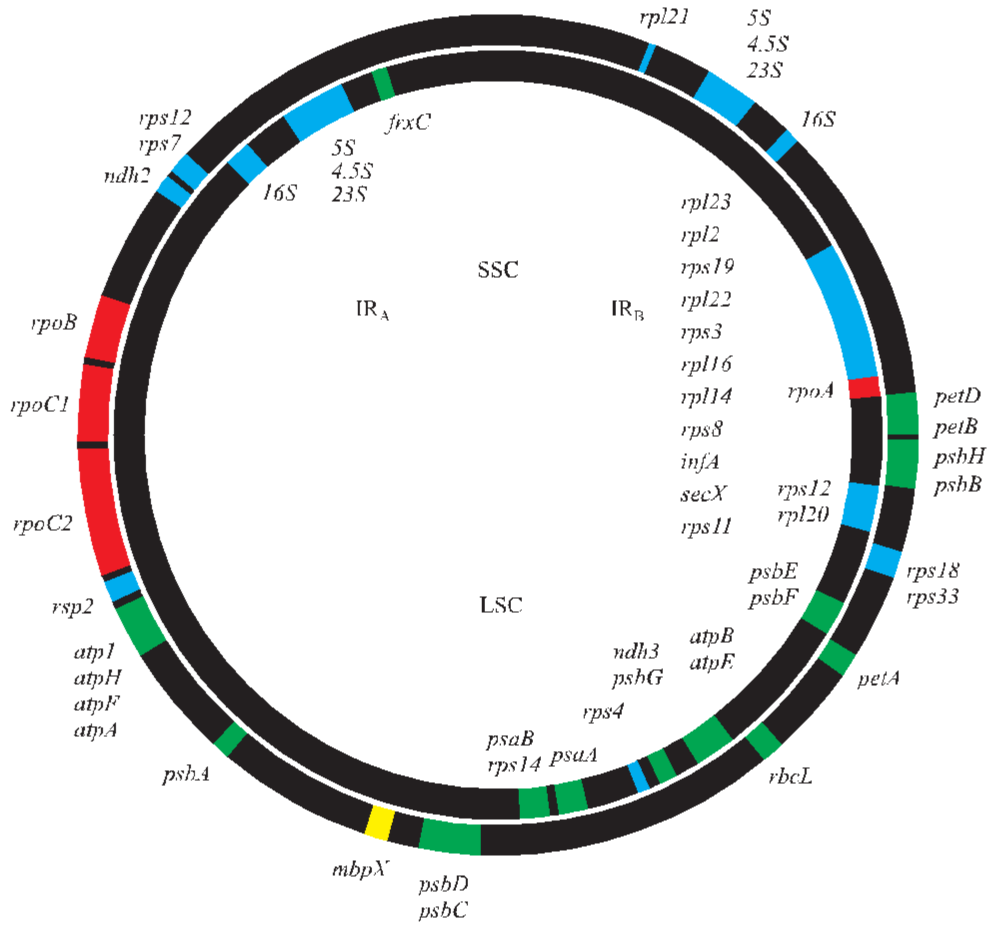
Размеры молекулы хпДНК составляют 80–600 тпн. На рис. 9.9 представлена схема ге-

Рисунок 9.8



Пики плавучей плотности ДНК из клеток водоросли *Chlamydomonas*, полученные в результате центрифугирования в градиенте плотности CsCl

Рисунок 9.9



Генетическая карта хлоропластной ДНК печеночного мха *Marchantia polymorpha* [Umesono, Ozeki, 1987].

IR_A, IR_B, LSC, SSC (во внутреннем круге) — инвертированные повторы и однокопийные участки. Синим цветом обозначены гены, кодирующие белки и РНК, участвующие в трансляции (*rps* — белки 30S, *rpl* — 50S субъединицы рибосомы; *4.5S*, *5S*, *16S*, *23S* — рРНК; *infA* — инициирующий фактор; *secX* — белок 50S субъединицы рибосомы), зеленым — в фотосинтезе и переносе электронов (*rbc* — рибулозобифосфаткарбоксилазу; *psa* — фотосистему 1; *psb* — фотосистему 2; *pet* — комплекс цитохром b/f; *atp* — АТР-синтетазу; *frx* — железо-серные белки; *ndh* — NAD(P)H оксидоредуктазу), красным — гены субъединиц РНК-полимеразы, желтым — пермеазы

нетической организации одного из видов хпДНК.

Число копий молекулы на одну клетку варьирует. Например, в листьях свеклы находят 4–8 молекул ДНК на нуклеоид, при этом 4–18 нуклеоидов находят в одном хлоропласте, а в клетке — примерно 40 хлоропластов. В итоге в каждой клетке может быть до 6000 молекул хпДНК. У водоросли хламидомонады один хлоропласт содержит 500–1500 молекул хпДНК [Russell, 1998].

Геном хлоропластов у высших растений варьирует по длине, но имеет характерные особенности. В геноме есть так называемые инвертированные повторы (IR_A и IR_B). Гены, находящиеся в пределах этих повторов, присутствуют в геноме в двух копиях. Между IR расположены участки SSC (short single copy sequence) и LSC (long single copy sequence). Геном хлоропластов содержит гены для всех рРНК (16S, 23S, 4,5S и 5S, в двух копиях каждый), до 32 генов тРНК и гены для некоторых, хотя и не всех белков, необходимых для генетического аппарата хлоропластов (например, рибосомных белков, субъединиц РНК-полимеразы, факторов трансляции и т. д.) или для фотосинтеза. В некоторых генах, кодирующих белки и тРНК, найдены интроны. Все мРНК, кодируемые в геноме хлоропластов, транслируются на собственных рибосомах хлоропластов.

Литература к разделу 9.2

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 331–335.

Игамбердиев А. У. Уникальная генетическая система митохондрий // Соросовский образовательный журн. 2000. № 6. С. 32–36.

Прозоров А. А. Геном бактерий: нуклеоид, хромосома, нуклеотидная карта // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 437–451.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli K-12* // Science. 1997. Vol. 277. P. 1453–1462.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 735–745, 772–776.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 679–713.

Umesono K., Ozeki H. Chloroplast gene organization in plants // Trends in Genetics. 1987. Vol. 3. P. 281–287.

Wallace D. C. Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases // The Molecular and Genetic Basis of Neurologie and Neurological Disease. Boston, 1997. P. 237–269.

Wallace D., Lott M.T., Torroni A. et al. Report of the committee of human mitochondrial DNA // Cytogen. Cell Genet. 1992. Vol. 59. P. 727.

9.3. ГЕНОМ И ХРОМОСОМЫ ДРОЖЖЕЙ

Хромосомы этих низших эукариот не видны под микроскопом, однако по генетическим данным выделяют 16 групп сцепления. Геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к настоящему времени полностью секвенирован. Общая длина ДНК в геноме составляет 13 390 тпн, длина хромосом варьируют от 229 до 1530 тпн (рис. 9.10). Понятно, почему хромосомы дрожжей невидимы под микроскопом. Самая маленькая хромосома в кариотипе дрозофилы — четвертая, которая выглядит как точка, по оценкам составляет 1–4 % ДНК генома [Hochman, 1974]. Если весь геном плодовой мушки содержит 185 млн пн ДНК, то следует заключить, что в четвертой хромосоме содержится от 1850 до 7400 тпн. Это значительно больше, чем в самой длинной хромосоме дрожжей.

В геноме дрожжей выявлено 6085 генов.

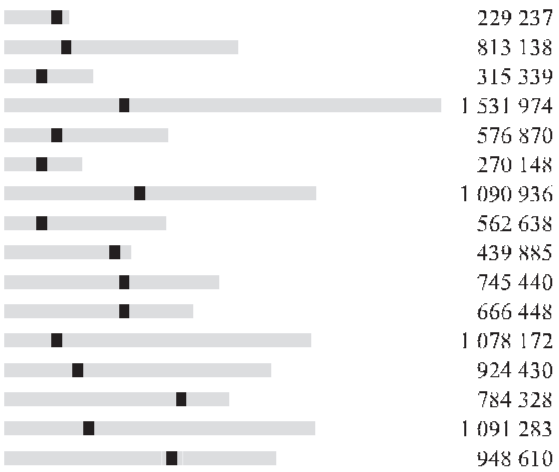
Литература к разделу 9.3

Clayton R. A., White O., Ketchum K. A., Venter J. C. The first genome from the third domain of life // Nature. 1997. Vol. 387. P. 459–462.

Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H. et al. Life with 6000 genes // Science. 1996. Vol. 274. P. 546, 563–567.

Hochman B. Analysis of a whole chromosome in *Drosophila* // Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 1974. Vol. 38. P. 581–589.

Рисунок 9.10



Длина хромосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Цифры указывают длину ДНК в хромосоме (в пн), черным цветом обозначены центромеры

9.4. МИТОТИЧЕСКИЕ ХРОМОСОМЫ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

9.4.1. Идентификация хромосом

Долгое время после открытия митотических хромосом их рассматривали как преимущественно однородные структуры, имеющие одинаковые размеры и форму. Эта кажущаяся однородность не позволяла определять индивидуальные хромосомы, связывать их с определенными группами сцепления, следить за перемещениями их отдельных элементов при хромосомных перестройках, возникающих в результате экспериментальных воздействий или в эволюции. Поэтому любые методы, позволяющие выявить индивидуальные характеристики хромосом, представляют огромную ценность для практической цитогенетики.

Справедливости ради следует упомянуть, что отдельные особенности хромосом начали отмечать сразу после их открытия. Еще в 1882 г. Э. Страсбургером было обнаружено у одного из исследованных им растений, а именно *Funkia sieboldiana*, что хромосомы одной и той же ядерной пластинки весьма резко различаются по величине. Аналогичные наблюдения были сделаны впоследствии для целого ряда растений и животных. Несколько позже К. Мюллер (C. Muller, 1912) посвятил целое исследование варьированию размеров хромосом. Указанные различия не просто являлись варьированием, а характеризовали собой определенные типы более крупных и мелких хромосом, точно повторявшиеся в разных ядерных пластинках одного и того же вида. Каждый тип был представлен в соматических клетках парой одинаковых элементов, очевидно, отцовского и материнского происхождения. Такого рода данные наряду с постоянством числа хромосом наглядно иллюстрировали индивидуальность хромосом, понимаемую как определенные, характерные для каждой пары особенности.

Рисунок 9.11

Сергей Гаврилович Навашин
(1857–1930)

Точным установлением того факта, что каждой хромосоме присущи, помимо определенного абсолютного (или относительного) размера, еще и постоянные и характерные особенности в построении их тела, наука обязана трудам С. Г. Навашина (рис. 9.11), выполненным в 1910–1914 гг.

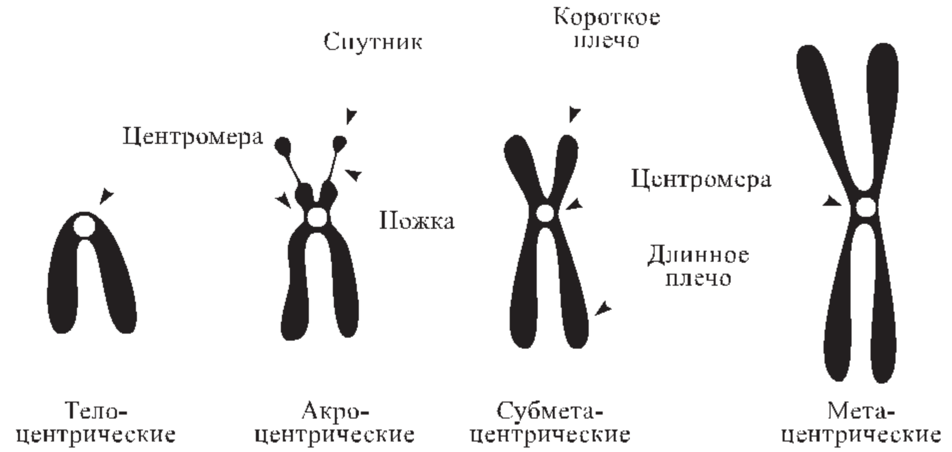
Уже в ранних работах Навашин выделяет три типа хромосом: 1) U-образные, почти равноплечие, 2) U-образные, явственно неравноплечие, 3) крючковидные, один членик которых настолько короток, что может даже ускользнуть от наблюдения [Навашин, 1911. — Из: Левитский, 1968].

В 1912 г. на заседании физико-математического отдела Академии наук состоялось знаменитое сообщение С. Г. Навашина. Он установил у неоднократно до того подвергавшегося исследованию растения *Galtonia candicans* наличие особых мельчайших, но вполне постоянных придатков, присоединенных при помощи «ниточки» к двум «средним» хромосомам. Придатки эти были названы С. Г. Навашиным «спутниками» (satelles — лат.). Спутники при делении ядра расщепляются вместе с остальным телом хромосомы. Таким образом, впервые была показана возможность идентификации хромосом по особенностям их строения.

В 1914 г. С. Г. Навашин установил, что в участке прикрепления нитей веретена образуется перетяжка материала хромосомы и эта перетяжка расположена в характерных местах в трех ранее установленных типах хромосом.

Из-за того что данные Навашина были опубликованы на русском языке, к тому же в специальных изданиях, а также из-за последовавших вскоре политических пертурбаций, его работа осталась совершенно неизвестной за границей. Факты, установленные Навашиным, постепенно открывались иностранными учеными вторично, например, много позже Ньютоном и Тейлором [Newton, 1924; Taylor, 1924]. Оба они с большим отставанием от-

Рисунок 9.12



Типы метафазных хромосом [МакКьюсик, 1967. С. 25]

крыли спутники и перетяжки хромосом в месте прикрепления нитей веретена [Левитский, 1968].

Фактически в соответствии с классификацией Навашина выделяют 4 типа хромосом в зависимости от положения центромеры и определяемой этим положением относительной длины плеч, т. е. частей хромосомы по обе стороны от центромеры (рис. 9.12).

По мнению многих ученых, любая хромосома имеет два плеча, т. е. телоцентрической хромосомы в природе не существует. У телоцентрических хромосом во всех случаях обнаружено наличие второго, пусть очень короткого плеча. Современные данные свидетельствуют о том, что на каждом конце хромосомы должна быть специальная структура — теломера с некоторым количеством прителомерного гетерохроматина (см. разд. 9.6). Таким образом, центромера не может находиться на самом конце хромосомы, и телоцентрики в природе действительно не существуют.

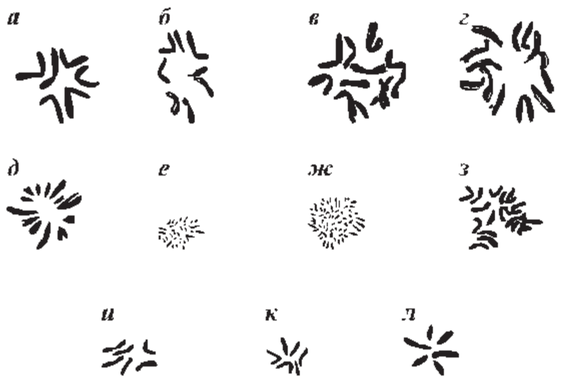
9.4.2. Кариотип и идиограмма

Понятие кариотипа ввел Г. А. Левитский (см. рис. 1.21) в 1924 г.

В книге «Материальные основы наследственности» (1924) он пишет: «Если внешние особенности организма вообще обозначаются как „фенотип", то специально для ядерных его особенностей будет подходящим термин „кариотип". Понятие „кариотипа", с одной стороны, составляет в качестве комплекса „признаков" часть понятия фенотипа, с другой же — оно самым тесным образом связано с понятием „генотипа", т. е. совокупности наследственных факторов или генов организма» [Левитский, 1978. С. 78]. Индивидуальные хромосомы, по Левитскому, составляют кариотип — хромосомный комплекс вида со всеми его особенностями: числом и размерами хромосом, их морфологией, наличием видимых под световым микроскопом деталей строения, перетяжек, спутников, соотношением длин плеч, чередованием эу- и гетерохроматина (рис. 9.13).

Важнейшим признаком кариотипа служит наличие пар гомологичных хромосом. Оба гомолога в паре имеют одинаковое генетическое

Рисунок 9.13



Гаплоидные кариотипы в микроспорах представителей семейства *Commelinaceae* [Anderson, Sax, 1936. — Из: Прокофьева-Бельговская, 1966. С. 286]:

а — *Tradescantia humilis*; *б* — *Tradescantia* sp.; *в* — *T. canaliculata*; *г* — *T. rosea*; *д* — *T. micrantha*; *е* — *T. geniculata*; *ж* — *Tradescantia* sp.; *з* — *Setcreasea brevifolia*; *и* — *Rhoco discolor*; *к* — *Spironema fragrans*; *л* — *Callisia repens*

содержание, размер, положение центромер, рисунок хромомеров. Пары гомологов индивидуальны по этим особенностям и отличаются от хромосом любой другой пары. Хромосомы из разных пар называют негомологичными.

Группируя хромосомы попарно и располагая их в порядке уменьшения длины, можно построить идиограмму — диаграмматический рисунок кариотипа (рис. 9.14).

Диплоидное число хромосом у разных организмов варьирует в очень широких пределах [Прокофьева-Бельговская, 1966. С. 286, с дополнениями]:

Человек	46
Горилла	48
Собака	78
Крыса	42
Мышь	40
Дрозофила	8
Аскарида	2
Речной рак	116
Сазан	104
Малярийный плазмодий	2
Лилия	24
Лук	16
Рожь	14
Кукуруза	20
Пшеница	42
Радиолярия	1600
Томат	24
Картофель	48
Крыжовник	16
Вишня	32

А. П. Акифьев (1993) обратил внимание на интересный факт. У эукариот, за исключением дрожжей, нет нормальных хромосом, которые имели бы размеры, меньшие определенных, например, не были бы видны в световой микроскоп. Это означает, что существует своего рода «критическая масса» хромосом, которая не может быть потеряна ни при каких обстоятельствах. Акифьев отмечает, что в соматических клетках хромосомы могут быть реорганизованы в широких пределах, вплоть до их полного распада в макронуклеусах некоторых инфузорий. Однако прохождение митоза и мейоза, по-видимому, невозможно без типичных хромосом, поддерживающих критическую массу. По мнению А. П. Акифьева, функция избыточной ДНК состоит в поддержании критической массы хромосомы.

Как кариотип, так и идиограмма позволяют морфологически определить каждую хромосому, но очень часто получить четкую характеристику, позволяющую идентифицировать отдельные хромосомы, не удается. Такую возможность предоставляют методы дифференциальной окраски хромосом.

9.4.3. Дифференциальные окраски хромосом

В 1968 г. Т. Касперссон (T. Caspersson) и его коллеги предложили метод окрашивания хромосом квинакрином (акрихин-ипритом) с последующим облучением их ультрафиолетом и индукцией флуоресценции. Оказалось, что в разных районах хромосом выявляется разное число сайтов связывания красителя, которые к тому же сильно варьировали по размерам и интенсивности свечения. Наборы флуоресцирующих полос создавали индивидуальность не только целых хромосом, но даже их плеч. В результате каждую хромосому оказалось возможным идентифицировать. Этот метод получил название Q-окраска, или Q-banding (от слова quinacrine).

В 1971 г. К. Шо (C. Shaw), Э. Самнер (A. Sumner) и У. Шнедл (W. Schnedl) предложили метод G-окраски. Препараты после предварительной щелочной обработки инкубируют в стандартном солевом растворе (2 × SSC), а затем окрашивают красителем Гимза–Романовского. В результате появляются темные поперечные полосы.

В настоящее время существует большое число методов, с помощью которых выявляется сегментация хромосом, но их можно подразделить на шесть основных классов: Q-, G-, R-, T-, C-окраски и окраска по Фельгену. Эта классификация методов дифференциальной окраски была предложена Парижской конференцией в 1971 г. Кроме того, позднее были разработаны методики дифференциального переваривания хромосом энзимами, а также флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

H- и Q-окраска. Эффективными в выявлении гетерохроматина являются флуоресцирующие красители, такие как квинакрин (Q-окраска) и Хекст (Hoechst 33258 — H-окраска). Оба они связываются с районами хромосом, обогащенными А–Т-парами, но механизмы окраски у них разные. Квинакрин интеркалирует в молекулу ДНК, Хекст связывается с наружной стороны молекулы в ее узкой бороздке.

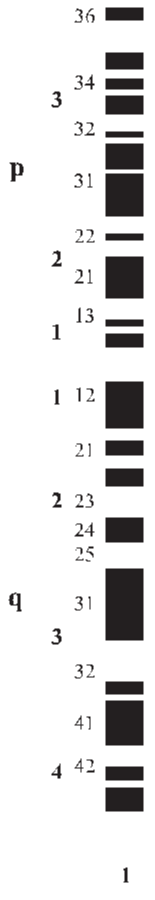
G-окраска. Этот тип дифференциальной окраски интересен по многим причинам. Прежде всего, поперечные полосы являются удобными маркерами различных частей хромосом. Полосам присвоены определенные номера и относительно них картируют гены (рис. 9.15).

Однако, как выяснилось, число полос и их интенсивность в работах разных исследователей варьировали. Для стандартизации анализа кариотипов Парижская номенклатура устанавливает нормы числа G-полос в хромосомах

Рисунок 9.14

Идиограмма хромосом серого хомячка (фотография О. В. Саблиной и С. И. Раджабли)

Рисунок 9.15



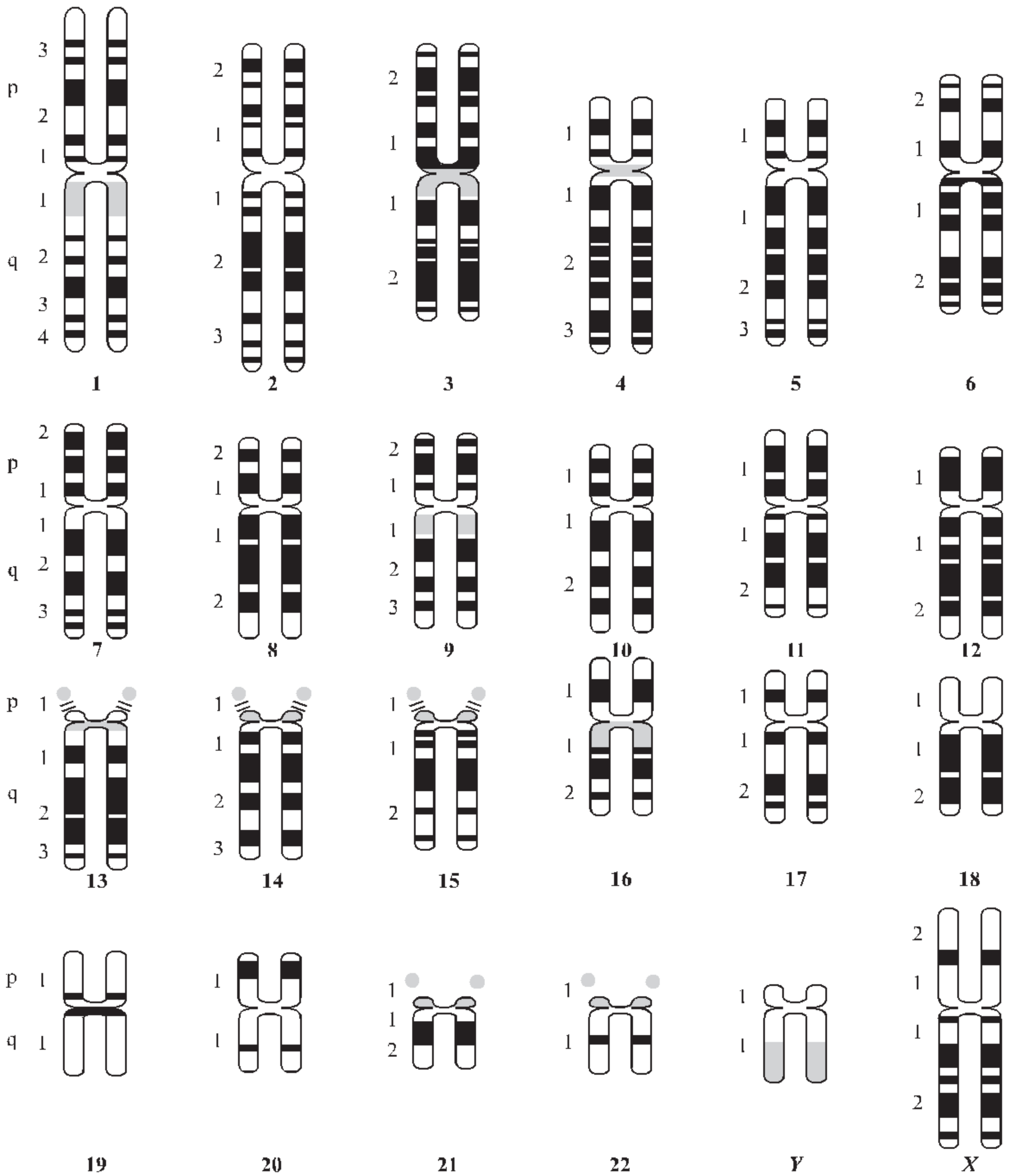
Рак груди (протоков) °
Недостаточность енолазы
Нейробластома °
?Гемолитическая анемия Rh-ноль
Эритробластоз плода
Эллиптоцитоз-1
Эритрокератодермия вариабельная
Гипофосфатазация младенческая
Фукозидоз
Поздняя подкожная порфирия
Порфирия гепатоэритропоэтическая
Недостаточность галактоэпимеразы
Ceroid lipofuscinos, нейронный-1, детский
Недостаточность C8, типы I и II
Лейкемия/лимфома Т-клеточная
Недостаточность ацил-CoA-дегидрогеназы, средняя цепь
Болезнь кленового сиропа, тип 2
Недостаточность миоаденилатдеаминазы
Недостаточность AMP-деаминазы эритроцитов
Гиперплазия надпочечников, тип II
Гипотироидизм незобный
Миопатия из-за недостатка CTP-азы
Гипераммониемия из-за недостатка CTP-азы

Болезнь Гоше, 2 и более типа
Гемолитическая анемия в результате недостатка ПК
Эллиптоцитоз-2
Пиропойкилоцитоз
Сфероцитоз, рецессивный
Недостаточность антитромбина III
Болезнь Шарко–Мари–Туз, тип Ib
Подверженность малярии, вызываемой *Plasmodium vivax*
Синдром Криглера–Наджара
Немалиновая миопатия
Недостаточность фактора V
Системная красная волчанка
Нейтропения иммунная
Катаракта опоясывающая, пулверулентная
Хронический грануломатоз в результате недостаточности NCF-2
Гликогенoз VII
Недостаточность фактора XIIIB
Недостаточность CR1
Недостаточность фактора H
Синдром Ушера, тип 2
Синдром ван дер Вуда
Недостаточность фумаразы

Гены болезней, картированные в первой хромосоме [McKusick, 1992. — Из: Пузырев, 1996. С. 25].

Рамкой обведены аллельные состояния; ° — новообразования, связанные со специфической хромосомной перестройкой, онкогеном или потерей гетерозиготности опухолевых клеток; курсивом отмечена несовместимость матери и плода; p — короткое, q — длинное плечо; 1–3, 1–4 — районы хромосом

Рисунок 9.16



Схематическое изображение G-сегментов хромосом человека и система их обозначения согласно решениям Парижской конференции в 1971 г.

Цифрами обозначены номера хромосом; *X* и *Y* — половые хромосомы; p — короткое, q — длинное плечи хромосом

человека. Кроме того, эти полосы должны быть в определенных позициях (рис. 9.16).

В соответствии с номенклатурой существуют три типа карт полос, составленных при уровнях разрешения 400, 550 и 850 полос на геном человека. Кроме того, имеется высокоразрешающая методика (high resolution), и карты, построенные с ее применением, включают около 1250 полос.

Маркировка хромосом с помощью G-метода позволяет идентифицировать индивидуальные хромосомы и их фрагменты, следить за их

перемещениями в ходе эволюции, под воздействием мутагенов и различных экологических факторов.

Кроме этого сам по себе набор темных полос в хромосомах отражает определенное состояние этих районов. Установлено, что районы, соответствующие G-полосам, обеднены генами, в них повышенное содержание нуклеотидов A, T и LINE-элементов. ДНК из G-полос является позднореплицирующейся в S-периоде [Craig, Bickmore, 1993].

R-окраска. В результате инкубации препаратов хромосом в буферном растворе при высокой температуре или при определенном значении pH с последующей обработкой красителем Гимза выявляется сегментация хромосом, обратная G-сегментации. В R-полосах высокая концентрация генов, они обогащены нуклеотидами G, C и SINE-элементами, и ДНК этих фрагментов рано реплицируется в S-периоде.

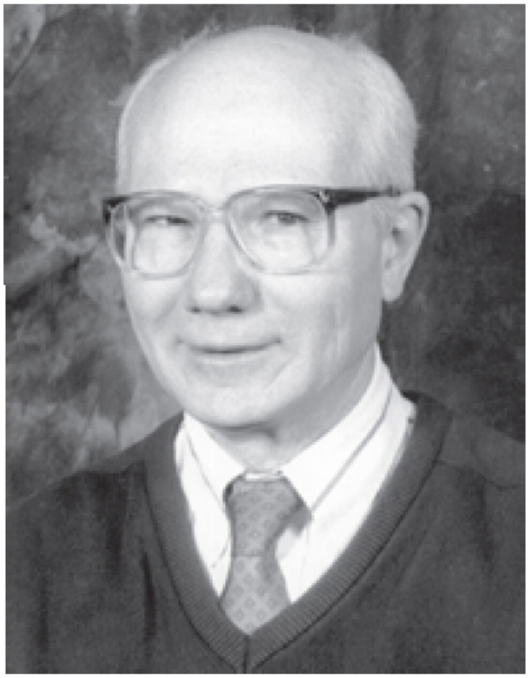
T-окраска. Это по существу вариант R-окраски, но окрашенные фрагменты, как правило, выявляются преимущественно на концах плеч хромосом в районах теломер. В этих полосах обнаружена самая высокая плотность генов, очень высокая концентрация нуклеотидов G, C и SINE-элементов. ДНК реплицируется очень рано.

Окраска по Фельгену. После мягкой щелочной обработки с последующей длительной экспозицией в холодном солевом растворе сегментация может быть выявлена с помощью реакции Фельгена.

C-окраска. В 1970 г. Дж. Голл (J. Gall) (рис. 9.17) и М. Пардью (M. Pardue) обнаружили, что прицентромерный гетерохроматин (см. разд. 9.5) в хромосомах мыши после денатурации–ренатурации ДНК окрашивается красителем Гимза более интенсивно, чем эухроматин. А в 1971 г. Т. Шу (T. Hsu) и Ф. Арриги (F. Arrighi) предложили методику обработки препаратов хромосом, позволявшую дифференцированно окрашивать эу- и гетерохроматин. Основными этапами процедуры являлись денатурация ДНК хромосом в 0,7 N NaOH, тепловая ренатурация (65 °C) и окраска в растворе Гимза. Обработав таким образом препараты хромосом 20 видов млекопитающих, авторы нашли, что районы прицентромерного гетерохроматина, имеющего большую плотность при обычных окрасках, также интенсивно окрашивались, а эухроматин оставался бесцветным. Авторы назвали эту процедуру обработки методикой окраски на конститутивный (C — constitutive) гетерохроматин, или C-окраской (C-banding).

Механизм окрашивания не выяснен. И хотя в большинстве случаев расположение C-полос

Рисунок 9.17



Джозеф Голл
(р. 1928)

хромосом совпадает с локализацией сателлитных ДНК, известны и очень важные исключения, например, *Y*-хромосома *D. hydei* не содержит сателлитных ДНК, но обнаруживает четкую C-окраску.

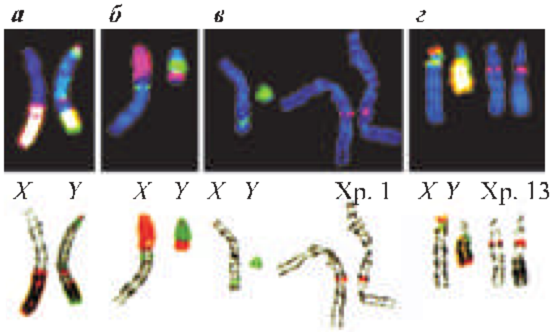
Кроме того, в раннем эмбриональном развитии гетерохроматин не окрашивается с помощью этого метода, но на более поздних этапах окраска этих же районов выявляется. Поскольку первичная структура ДНК сохраняется одной и той же, следует считать, что C-окраска выявляет белки, специфичные для гетерохроматина.

По результатам проекта «Геном человека», опубликованным в феврале 2001 г., около 20 % геномной ДНК *Homo sapiens* локализовано в C-полосах хромосом.

Дифференциальное энзиматическое переваривание хромосом. Гетерогенность распределения пар нуклеотидов в митотических хромосомах обнаруживается с помощью переваривания ферментами рестрикции. Участки хромосом, обогащенные повторами, не содержащими сайты для данного фермента, остаются неповрежденными и выявляются при окраске любыми красителями на ДНК, например, бромистым этидием. Очень часто такие участки имеются в районах прицентромерного гетерохроматина.

Многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ*. В цитогенетике в 1990-х гг. по-

Рисунок 9.18

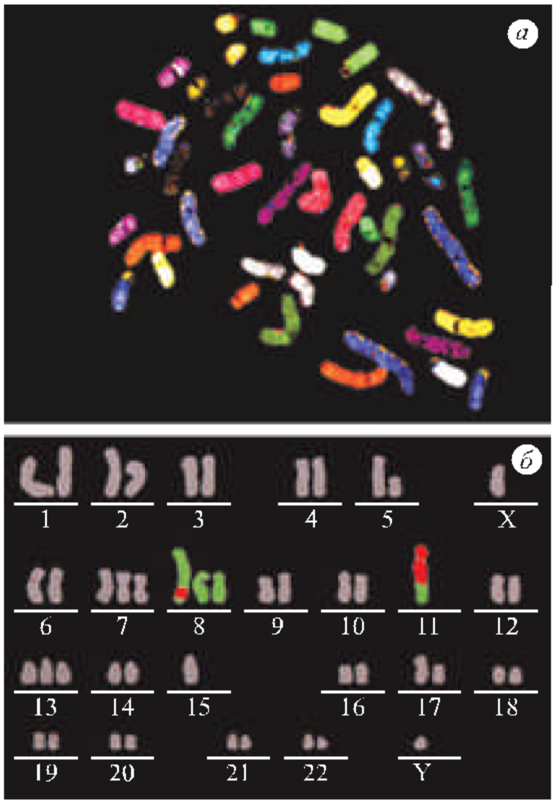


Одновременная локализация двух фрагментов повторенной ДНК из генома полевок (*Microtus*) в митотических хромосомах:

а — *M. rossiaemeridionalis*; *б* — *M. transcaspicus*; *в* — *M. arvalis arvalis*; *г* — *M. kirgisorum* [Elisaphenko et al., 1998. P. 356].

В верхнем ряду — хромосомы окрашены DAPI — синий цвет, один из сателлитов дает фиолетовый псевдоцвет, другой — зеленый, в районах совместной локализации появляется белый псевдоцвет. В нижнем ряду — локализация тех же фрагментов (красный и зеленый цвета) на G-окрашенных хромосомах (серый цвет)

Рисунок 9.19



24-цветная FISH-окраска хромосом человека [Ferguson-Smith, 1997. — Из: Рубцов, Карамышева, 2000]:

а — метафазная пластинка, на которой каждая хромосома окрашена в свой псевдоцвет; *б* — наличие зеленого и красного псевдоцветов в 8-й и 11-й хромосомах свидетельствует о транслокации между ними

явились новые мощные методы, в основе которых лежит флуоресцентная гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization — FISH). Связано это с применением новых более эффективных флуорохромов и новой аппаратуры для анализа микроскопических изображений — цифровых фотоаппаратов, соединенных с микроскопом и компьютером (CCD-камер) вместо фотокамер. Одним из наиболее разрешающих методов является многоцветная гибридизация *in situ*.

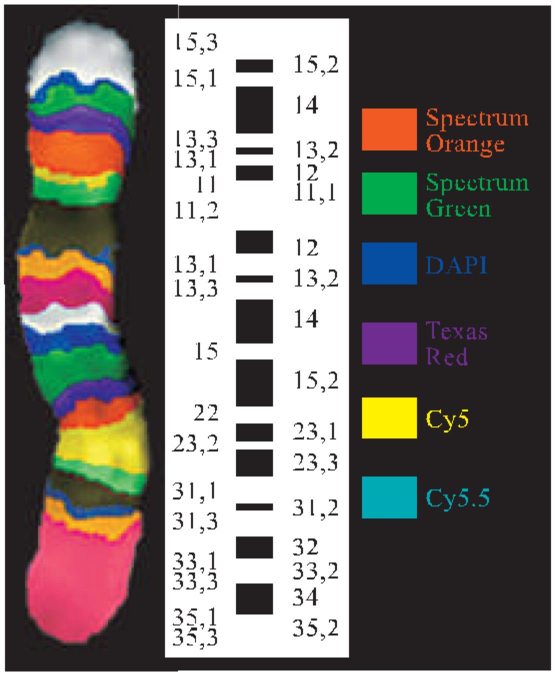
Для получения многоцветных изображений используют разные флуорохромы, которыми метят разные зонды ДНК. Информация об интенсивности свечения каждого из флуорохромов записывается в компьютере отдельно, и каждому из таких изображений присваивается свой собственный псевдоцвет. Одновременное использование нескольких флуорохромов позволяет получить значительно большее число псевдоцветов. Например, если фрагмент хромосомы, окрашенный флуорохромом *a*, будет давать один псевдоцвет, фрагмент, окрашенный флуорохромом *b*, — другой, то фрагмент, окрашенный *a* и *b* одновременно, будет давать третий псевдоцвет (рис. 9.18).

В дополнение к этим двум флуорохромам обычно используют третий — для общей окраски хромосом. Очевидно, что использование *n* флуорохромов позволяет одновременно определять локализацию $2^n - 1$ фрагментов ДНК. То есть применение пяти флуорохромов дает возможность анализировать результаты одновременной гибридизации *in situ* 31 фрагмента ДНК.

Для мечения каждой хромосомы своим цветом ДНК этой хромосомы собирают микроманипулятором с препарата, амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции и метят комбинацией из трех флуорохромов. В результате данная хромосома приобретает свой псевдоцвет. Аналогичную операцию проводят с другими хромосомами, в результате чего каждая хромосома кариотипа приобретает свой собственный псевдоцвет (рис. 9.19, *а*). Окраска хромосомы более чем одним цветом свидетельствует о наличии транслокации (рис. 9.19, *б*).

Если сделать библиотеку фрагментов ДНК не из целой хромосомы, а из отдельных участков индивидуальных хромосом, то можно идентифицировать положение этих участков (рис. 9.20).

Рисунок 9.20



Многоцветная исчерченность пятой хромосомы человека [Ferguson-Smith, 1997. — Из: Рубцов, Карамышева, 2000].

Слева — хромосома, «раскрашенная» 22 полосами по результатам FISH, справа — хромосома, окрашенная G-окраской

Уже в настоящее время в ряде диагностических центров некоторые варианты многоцветной FISH используются в качестве рутинных методик при анализе хромосомных перестроек у человека.

Привлекательность метода заключается в том, что слабый сигнал при обычной гибридизации *in situ* может быть многократно «усилен» еще на препарате, а затем «доработан» с помощью CCD-камеры компьютера, в результате чего легко выявляется даже в митотических хромосомах. Поэтому FISH широко используется в цитогенетических работах: с 1995 по 1998 г. в мире ежегодно публиковали почти по 1000 статей с использованием этого метода [MacGregor, 2000].

9.4.4. «Правило Мёллера» и синтения

В 1911 г. У. Робертсон (W. Robertson) обнаружил, что метацентрическая хромосома у одного из видов прямокрылых насекомых соответствует двум акроцентрическим хромосомам у другого вида и заключил, что в ходе эволюции метацентрики могут возникать за счет слияния акроцентриков. Такие слияния целых плеч хромосом стали называть робертсоновскими

Рисунок 9.21

Схема формирования метацентрической хромосомы из двух акроцентриков за счет робертсоновской транслокации

слияниями (транслокациями) (рис. 9.21). Число больших плеч хромосом при этом остается близким к постоянному.

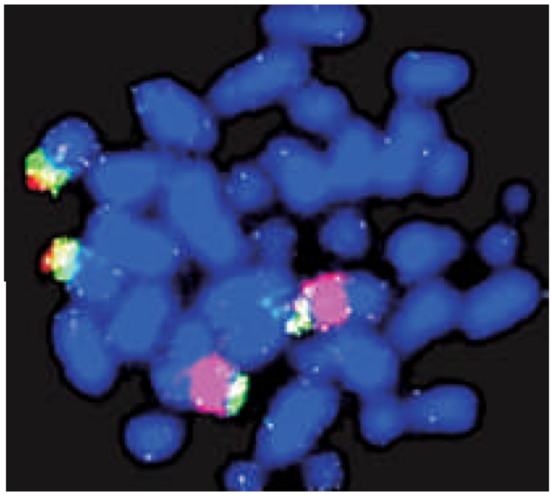
В 1934 г. Н. П. Дубинину удалось изменить число хромосом в кариотипе экспериментальным путем. Вначале с помощью транслокации четвертую хромосому дрозофилы перенесли на *Y*-хромосому. Потом посредством кроссинговера между гибридной хромосомой 4–*Y* и *X*-хромосомой четвертая была перенесена на *X*-хромосому. После этого у самок хромосома 4–*X* была переведена в гомозиготу, в результате чего в кариотипе стало 3 пары хромосом. У самца кариотип содержал по две пары аутосом, 4–*X* и 4–*Y*, т. е. тоже шесть хромосом. Таким образом, возникла раса с тремя парами хромосом. Еще через два года были опубликованы результаты создания расы с пятью парами хромосом, у которой были 3 пары нормальных хромосом (*X*, вторая и четвертая), а также две пары перестроенных: хромосома, состоящая из части левого плеча 3-й хромосомы и центромеры хромосомы 4, и хромосома, состоящая из правого плеча и проксимальной части левого плеча 3-й хромосомы. Эти работы показали возможность экспериментального превращения кариотипа у животных как в сторону уменьшения числа пар хромосом, так и в сторону увеличения.

Робертсоновские слияния происходят в ходе эволюции в популяциях, в том числе и в популяциях человека. В 1960 г. П. Полани (P. Polani) с соавторами показали, что синдром Дауна возникает в результате робертсоновской транслокации.

Кариологами было установлено, что у человека 23 пары хромосом, а у крупных человекообразных обезьян — 24. В результате кариологического анализа удалось выяснить, что два плеча крупной второй хромосомы человека соответствуют двум разным хромосомам обезьян (это хромосомы 12 и 13 у шимпанзе и 13 и 14 у гориллы и орангутана).

В 1940 г. Г. Мёллер предположил, что 6 плеч хромосом, составляющих кариотип разных ви-

Рисунок 9.22



Выявление гомологии между хромосомами человека и бурундука с помощью метода Zoo-FISH. ДНК из хромосом 12 (мечены красным цветом) и 22 (мечены зеленым цветом) человека гибридизовали с хромосомами бурундука (синий цвет). Видно, что маркеры из двух разных хромосом человека занимают по две пары хромосом бурундука, содержащих оба маркера.

Фотография любезно предоставлена А. С. Графодатским

дов дрозофил, сохраняются в эволюции неизменными. По его мнению, кариотип всего рода состоит из 5 палочковидных хромосом и точечной шестой хромосомы, в которых в ходе эволюции происходили лишь парацентрические инверсии и центрические слияния, в результате чего у близких видов группы сцепления сохраняются неизменными. Годом позже А. Стёртевант и Ю. Новицкий, картируя гены и составляя генетические карты у разных видов дрозофил, нашли, что элементы хромосомного набора имеют определенные и постоянные серии генов. Различия выявляются главным образом в порядке расположения генов в пределах каждой группы. Например, у *D. melanogaster* такие гены, как *y, w, sn* и *v* находятся в *X*-хромосоме. У других видов дрозофил эти гены также располагаются в *X*-хромосоме, однако порядок их сильно отличается из-за большого числа инверсий. Гомеология между различными хромосомными элементами была найдена для 26 видов дрозофил. В 80–90-х гг. нашли гомеологию между группами сцепления дрозофилы и других представителей отряда Diptera (*Musca domestica, Lucilia cuprina, Ceratitis capitata,* гавайские дрозофилы).

Применение правила Мёллера дает хорошие практические результаты, особенно при использовании метода гибридизации *in situ*. Так, имея по одному клону ДНК из генов или последовательностей, расположенных в 4 разных хромосомах *D. melanogaster*, и локализовав их в политенных хромосомах какого-то другого вида, можно быстро установить соответствие между группами сцепления *D. melanogaster* и индивидуальными хромосомами, а также группами сцепления другого вида.

Идентичные гены, расположенные в гомеологичных элементах хромосом разных видов, называют синтенными, а само явление гомеологии участков хромосом у отдаленных видов — синтенией.

У представителей рода *Chironomus* также обнаружена обширная гомеология различных плеч хромосом, которая довольно легко выявляется по рисунку дисков в политенных хромосомах. Эти данные используют для построения схем эволюционных взаимоотношений между различными видами этого рода. Уточняются таксономические данные хирономусов.

Широко распространены в последнее время опыты по перекрестной гибридизации ДНК одного вида с кариотипом другого, в результате чего в хромосомах разных видов можно выявить зоны гомеологии. Для этих целей применяют метод, предложенный в 1990 г. и называемый Zoo-FISH. Вначале выделяют одну хромосому из кариотипа какого-то организма с помощью особого метода-сортинга или микроклонирования, создают хромосомную библиотеку клонов ДНК, меченных указанными выше псевдоцветами. Затем, используя эту библиотеку в качестве зондов, проводят гибридизацию *in situ* на кариотипе организма другого вида (рода, семейства, класса), при этом прилагают особые усилия, чтобы подавить гибридизацию повторенных фракций, которые бы пометили все хромосомы. Чаще всего маркеры хромосом человека гибридизуют с хромосомами других видов, выявляя зоны гомологии (рис. 9.22).

По состоянию на 1998 г. в мире проводили подобные сопоставления на более чем 200 видах млекопитающих [Chowdhary et al., 1998]. Выявлены следующие типы консервативности расположения генов в хромосомах:

1) консервативная синтения, когда два или более гомологичных гена у двух видов расположены в одной хромосоме и при этом не имеет значения, в каком они порядке и какими асинтенными сегментами они перемежаются;

2) консервативный сегмент, когда два или более гомологичных гена у двух видов не раз-

делены негомологичными хромосомными сегментами;

3) консервативный порядок, когда три или более гомологичных гена лежат в одной хромосоме и в одном и том же порядке у двух видов [Andersson et al., 1996].

Некоторые примеры консерватизма удивительны. Например, хромосома 17 человека имеет полную гомологию с соответствующими целыми хромосомами свиньи, быка, лошади, кошки или с целыми плечами хромосом норки и тюленя, с отдельными сегментами хромосом оленя мунжака, овцы, шимпанзе, макаки, кита-финвала [Chowdhary et al., 1998]. Если брать целый кариотип, в результате гибридизации ДНК человека с метафазными хромосомами тюленя выявлено свыше 30 гомеологичных сегментов, т. е. протяженные районы хромосом одного вида присутствуют в хромосомах другого вида [Frönicke et al., 1997].

Еще более впечатляющие примеры гомеологии были обнаружены при сравнении строения генома у столь отдаленных видов, как рыбка *Fugu rubripes*, обитающая в Японском море, и человек. Известно, что у человека в 14-й хромосоме в районе локуса *AD3*, контролирующего развитие болезни Альцхаймера, расположены 3 других гена: дигидролипоамид сукцинилтрансферазы, *S31iii125*, *S20i15*, примыкающие к гену *FOS*. Первые три гена обнаружены в геноме рыбки *Fugu*, они также примыкают к локусу *cFOS*. Относительный порядок генов *cFOS*, *S31iii125* и *S20i15* был одинаков у обоих организмов. Однако у *Fugu* эти три гена лежат во фрагменте 12,4 тпн, в то время как у человека они занимают участок более чем 600 тпн. Размер генома у *Fugu* в 7,5 раза меньше, чем у человека, поэтому плотность генов на единицу длины ДНК у них выше [Trower et al., 1996].

Литература к разделу 9.4

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 55–58.

Акифьев А. П. Концепция базигенома и критической массы хромосом эукариот // Докл. АН. 1993. Т. 332. С. 96–98.

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 22.

Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. М.: Мир, 1981. С. 433–467.

Дубинин Н. П. Экспериментальное уменьшение числа пар хромосом у *Drosophila melanogaster* // Избранные труды. В 4 т. Т. 1. Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 273–290. (Биол. журн. 1934. Т. 3, № 4. С. 719–736).

Дубинин Н. П. Генетика. Кишинев: Штиинца, 1985. С. 54–57.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 66–67.

Левитский Г. А. Морфология хромосом и понятие «кариотипа» в систематике // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1931. Т. 27. С. 187–240.

Левитский Г. А. Морфология хромосом: История. Методика. Факты. Теория // Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968. С. 171–226.

Левитский Г. А. Материальные основы наследственности // Цитогенетика растений. Избр. тр. М.: Наука, 1978. С. 10–208. (Киев: Гос. изд-во Украины, 1924).

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 60–62.

МакКьюсик В. Генетика человека. М.: Мир, 1967. С. 22–27.

Прокофьева-Бельговская А. А. Строение и функция хромосом // Руководство по цитологии. В 2 т. Т. 2. М.; Л.: Наука, 1966. С. 280–329.

Пузырев В. П. Геномные исследования и болезни человека // Соросовский образовательный журн. 1996. № 5. С. 19–27.

Рубцов Н. Б., Карамышева Т. В. Многоцветие современной цитогенетики, или multicolor fish today // Вестн. ВОГиС. 2000. № 11. С. 11–15.

Суонсон К., Мерц Т., Янг У. Цитогенетика. М.: Мир, 1969. 280 с.

Andersson L. et al. Comparative genome organization of vertebrates // Mammalian genome. 1996. Vol. 7. P. 717–734.

Chowdhary B. P., Raudsepp T., Frönicke L., Scherthan H. Einerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH // Genome research. 1998. Vol. 8. P. 577–589.

Craig J. M., Bickmore W. A. Chromosome bands — flavours to savour // BioEssay. 1993. Vol. 15. P. 349–354.

Elisaphenko E. A., Nesterova T. B., Duthie S. M. et al. Repetitive DNA sequences in the common vole: cloning, characterization and chromosome localization of two novel complex repeats MS3 and MS4 from the genome of the East European vole *Microtus rossiaemeridionalis* // Chromosome Research. 1998. Vol. 6. P. 351–360.

Frönicke L., Muller-Navia J., Romanakis K., Scherthan H. Chromosomal homeologies between human, harbor seal *(Phoca vitulina)* and the putative ancestral carnivore karyotype revealed by Zoo-FISH // Chromosoma. 1997. Vol. 106. P. 108–113.

MacGregor H. C. The future of chromosomes // Chromosomes Today. Vol. 13 / E. Oemo, C. A. Redi (eds.) Switzerland: Birkhauser Verlag, 2000. P. 305–313.

McKusick A. Mendelian inheritance in man. Baltimor; London: John Hopkins University, 1992.

O'Brien S. J., Eisenberg I. F., Miyamoto M. et al. The promise of comparative genomics in mammals // Science. 1999. Vol. 286. P. 458–481.

Trower M. K., Orton S. M., Purvis I. J. et al. Conservation of synteny between the genome of the pufferfish (*Fugu rubripes*) and the region on human chromosome 14 (14q24.3) associated with familial Alzheimer disease (*AD3* locus) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 1366–1369.

9.5. ЭУХРОМАТИН И ГЕТЕРОХРОМАТИН

К началу XX в. стало известно, что некоторые хромосомы или их фрагменты во время клеточного деления выглядят более конденсированными и интенсивно окрашенными. Такие различия были названы (Gütherz, 1907) гетеропикнозом (от греч. гетерос — иной, пикнозис — плотность). Гетеропикноз может быть отрицательным при слабой и положительным при сильной окрашиваемости. В интерфазных ядрах цитологи находили сгустки интенсивно окрашенного материала, которые назвали хромоцентрами. Э. Хайц (E. Heitz), проанализировав поведение гетеропикнотических участков хромосом и интерфазных хромоцентров, пришел к выводу, что плотные, сильно окрашенные районы хромосом не деконденсируются в телофазе, сохраняя свою плотность. В последующей интерфазе они и образуют хромоцентры. Для обозначения районов хромосом, демонстрирующих положительный гетеропикноз на всех стадиях митотического цикла, Э. Хайц (рис. 9.23) в 1928 г. предложил термин «гетерохроматин». Он предложил различать эухроматин — основную часть митотических хромосом, которая претерпевает обычный цикл компактизации–декомпактизации во время митоза, и гетерохроматин — участки хромосом, постоянно находящиеся в компактном состоянии.

Рисунок 9.23

Эмиль Хайц
(1892–1965)

У большинства видов эукариот хромосомы содержат как эу-, так и гетерохроматиновые участки, причем последние, как правило, составляют значительную часть генома. Так, у *D. melanogaster* полностью гетеропикнотична *Y*-хромосома самца, в *X*-хромосоме доля гетерохроматина составляет около 40 %, во 2-й — 29 %, в 3-й — 25 % длины хромосом. По-видимому, большая часть 4-й хромосомы является гетерохроматиновой. Общая доля гетерохроматина в кариотипе дрозофилы составляет 33 %.

Гетерохроматин чаще всего располагается в прицентромерных, иногда в прителомерных областях. Обнаружены гетерохроматиновые участки в эухроматиновых плечах хромосом. Они выглядят как вкрапления (интеркаляции) гетерохроматина в эухроматин. Такой гетерохроматин называют интеркалярным. Понятно, что интеркалярный гетерохроматин легче заметить в сильно декомпактизованных хромосомах, таких как политенные, или в пахитенных хромосомах мейотической профазы.

Гетерохроматиновые районы обладают рядом свойств, отличающих их от эухроматина.

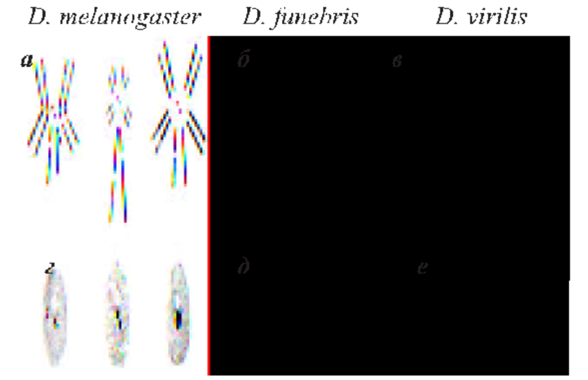
9.5.1. Компактизация хроматина

По данным Хайца, начиная с ранней профазы гетерохроматиновые районы хромосом становятся легко заметными и отличаются от эухроматиновых более интенсивной окраской. В конце метафазы эти различия исчезают. В телофазе эухроматиновые районы декомпактизуются, а гетерохроматиновые остаются положительно гетеропикнотичными и опять выявляются цитологически. В последующей интерфазе они представлены многочисленными сильноокрашенными зернами или крупными блоками гетеропикнотичного материала, издавна называемыми хромоцентрами (рис. 9.24).

Прицентромерные гетерохроматиновые районы окрашены более интенсивно.

Эта картина изменений в состоянии компактности позволила Дж. Шульцу (J. Schultz) в 1947 г. сформулировать представление о гетерохроматине как о районах хромосом, которые имеют специфическое свойство оставаться в виде блоков в межмитотической стадии. Таким образом, эухроматин и гетерохроматин различаются по циклам компактизации. В то время как первый проходит полный цикл компактизации–декомпактизации от интерфазы до интерфазы, второй сохраняет состояние относительной компактности.

Рисунок 9.24



Гетерохроматин (темные участки) в метафазных хромосомах (*а–в*) и интерфазных ядрах (зерна и глыбки) (*г–е*) у разных видов дрозофил [Heitz, 1934]

Однако постоянство компактности укладки гетерохроматиновых районов хромосом относительно. Об этом свидетельствуют следующие факты:

1. В клеточном цикле не находят сильного окрашивания гетерохроматина аутосом дрозофилы до стадии профазы.

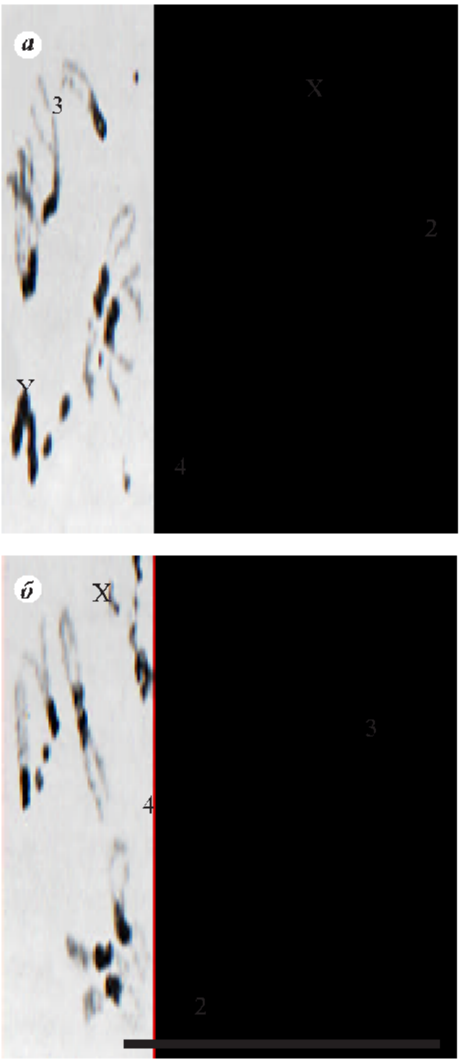
2. Гетерохроматиновых районов не находят в хромосомах эмбрионов на самых ранних этапах дробления.

3. В интерфазных ядрах хромосом дрозофилы число хромоцентров варьирует от 0 до 5. Их отсутствие может свидетельствовать о полной декомпактизации гетерохроматина на каких-то стадиях интерфазы, возможно, в конце S-периода, когда реплицируется ДНК гетерохроматина.

4. В ходе митотического цикла гетерохроматин так же, как и эухроматин, компактизуется. При измерении длины митотических хромосом дрозофилы, находящихся на разных стадиях компактизации, показано, что чем больше гетерохроматина в составе хромосом, тем меньше они укорачиваются. Измерения суммарной длины гетерохроматина всех хромосом дрозофилы показали, что она варьируют в пределах 4,1–7,2 мкм, в то время как длина всего гаплоидного набора — в пределах 13,4–67,0 мкм. Эти данные подтверждают представления, во-первых, о значительной компактности гетерохроматина уже на ранних стадиях митоза, а во-вторых, о том, что степень компактности гетерохроматина в клеточном цикле непостоянна и он все-таки компактизуется в профазе.

5. Существуют различные факторы, влияющие на компактизацию, — химические и физические.

Рисунок 9.25



Локализация эухроматина (светлые участки) и гетерохроматина (интенсивно окрашенные участки) в кариотипе дрозофилы по результатам С-окрашивания [Faccio Dolfini, 1974. — Из: Жимулёв, 1993. С. 22]:

а — самец, *б* — самка. Цифры — номера хромосом, *X* и *Y* — половые хромосомы, шкала — 10 мкм

Компактизация района хромосомы в клеточном цикле является основной характеристикой, определяющей принадлежность данного района к гетерохроматину.

9.5.2. *Дифференциальная окрашиваемость*

Как правило, у всех изученных видов обнаруживается хорошее совпадение в локализации гетерохроматиновых районов, выявляемых по аллоцикличности компактизации и с помощью С-окраски (рис. 9.25).

Разные участки гетерохроматина окрашиваются разными красителями, некоторые районы — только каким-то одним, другие — сразу несколькими, третьи — тоже несколькими, но другими. Применяя различные красители и используя хромосомные перестройки, разрывающие гетерохроматиновые районы, у дрозофилы удалось охарактеризовать много небольших районов, где сродство к окраскам отлично от такового в соседних участках. Все эти районы были пронумерованы (от 1 до 61), и таким образом была создана цитогенетическая карта гетерохроматина (см. рис. 9.32).

9.5.3. Конъюгация гетерохроматиновых районов

Одним из специфических свойств гетерохроматиновых районов является их сильно выраженная способность к контактам между собой. Фактически все известные данные о строении интерфазных ядер свидетельствуют о наличии в них одного или нескольких хромоцентров, образующихся в результате слияния гетерохроматиновых районов хромосом кариотипа.

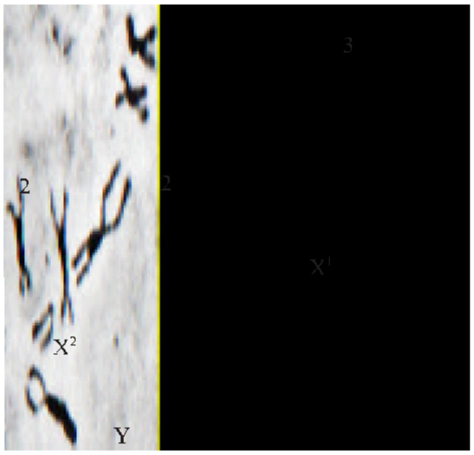
В ранней профазе гетерохроматиновые районы еще объединены в хромоцентр. Эухроматиновые части сестринских хроматид, тесно контактирующие в профазе митоза, отделяются друг от друга в метафазах, в то время как гетерохроматиновые районы сохраняют контакт вплоть до начала анафазы (рис. 9.26). Хроматиды хромосом, имеющих много гетерохроматина (например, *Y*-хромосомы или четвертой хромосомы у дрозофилы), никогда не расходятся до начала анафазы.

Конъюгация гетерохроматиновых районов хроматид осуществляется вследствие особенностей самого гетерохроматина, а не центромеры.

В пользу представлений о тесных контактах гетерохроматиновых районов гомологичных хромосом начиная от S-периода до метафазы свидетельствуют данные по индукции митотического кроссинговера. Более высокая частота мозаиков по генам *X*-хромосомы дрозофилы получена в линиях с более высоким содержанием гетерохроматина.

В профазе I мейоза районы прицентромерного гетерохроматина у дрозофилы выглядят объединенными в плотное темноокрашенное тело, которое тоже называют хромоцентром. Такие хромоцентры описаны у многих видов. Полагают, что хромоцентр является структурой, которая может играть роль в ориентации хромосом в профазе мейоза. Конъюгация негомологичных *X*- и *Y*-хромосомы в первом делении мейоза у самцов дрозофилы осуществляется за счет специальных сайтов, расположенных в гетерохроматине.

Рисунок 9.26



Конъюгация гетерохроматиновых районов сестринских хроматид в кариотипе *Drosophila athabasca*
[Paika, Miller, 1974. — Из: Жимулёв, 1993. С. 31]

9.5.4. Контакты гетерохроматина с ядерной оболочкой

Хромоцентры, состоящие из гетерохроматина интерфазных хромосом, расположены на ядерной оболочке (рис. 9.27).

Во время митотического деления связь гетерохроматиновых районов с внутренней мембраной ядра сохраняется вплоть до прометафазы.

9.5.5. Гетерохроматин и хромосомные перестройки

Широко известны представления о значительной роли гетерохроматиновых районов в эволюции кариотипа. По гетерохроматиновым районам происходят слияния и разделения плеч, что приводит к изменениям морфологии и числа хромосом в кариотипе.

Одним из основных механизмов, действующих в процессе эволюции хромосомных наборов, являются робертсоновские преобразования (см. рис. 9.21), в результате которых двуплечая хромосома разламывается на два акроцентрика или два акроцентрика, соединяясь, как правило, в гетерохроматиновых областях хромосомы, формируют одну двуплечую хромосому. Представления о самом механизме этих процессов долгое время были весьма противоречивы, так как никаких данных о способности центромеры к разрывам или слияниям без потери ее активности не имелось. Поэтому луч-

Рисунок 9.27

Изменение внешнего вида хромоцентра, расположенного на ядерной оболочке интерфазного диплоидного ядра в зависимости от угла зрения:
а — вид сверху, хромоцентр «на дне» ядра;
б, *в* — вид сбоку, хромоцентр в виде плоской пластины на ядерной оболочке

шее объяснение робертсоновскому процессу при возникновении двуплечей хромосомы из двух одноплечих давало представление о неравной транслокации. При этом предполагалось, что маленький центрический фрагмент одного из акроцентриков теряется.

По другому механизму это может быть соединение двух моноцентрических одноплечих хромосом с образованием двуплечей, в которой две близкорасположенные центромеры могут функционировать как одна или же одна из двух центромер может инактивироваться. Это С–С соединение хромосом (центромера к центромере). Возможность такого процесса обеспечивается свойствами гетерохроматиновых районов, в которых локализуется центромера. Примером С–С соединения служит образование хромосомы 2 у человека [Прокофьева-Бельговская, 1986].

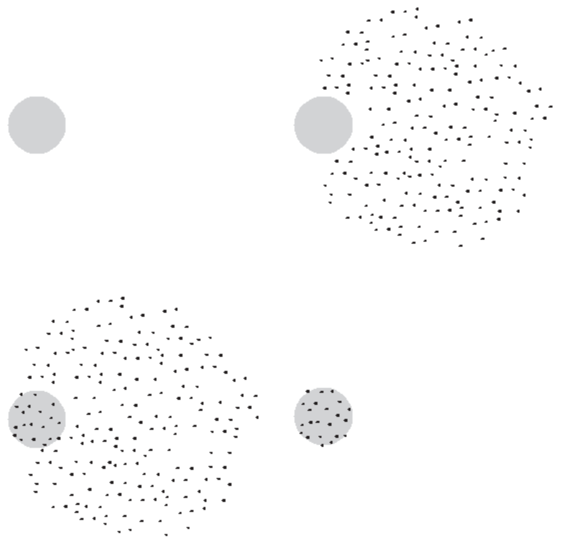
Внутривидовой полиморфизм кариотипов также во многом складывается из образования хромосомных перестроек, имеющих точки разрыва в гетерохроматине.

В культуре клеток дрозофилы хромосомные перестройки, индуцируемые ультрафиолетовым излучением, образуются преимущественно в гетерохроматине *X*- и *Y*-хромосом и аутосом. При обработке мутагенами дрозофил, несущих мутации по нарушениям рекомбинации и чувствительности к мутагенам, оказалось, что у мутантов по гену *mus109* около 80 % индуцированных разрывов картировано в гетерохроматине.

9.5.6. Поздняя репликация

Изучая распределение метки на радиоавтографах после включения ^{3}H-тимидина в клетки сперматоцитов саранчового *Melanoplus differentialis*, А. Лима-де-Фариа в 1959 г. обнаружил 4 типа мечения (рис. 9.28).

Рисунок 9.28



Типы включения ^{3}H-тимидина в ядра ранней пахитены мейоза *Melanoplus differentialis* [Lima-de-Faria, 1959a. — Из: Жимулёв, 1993. С. 34].
Половые хромосомы этого вида формируют хромоцентр, который на всех рисунках показан в левой части ядра на экваторе (объяснения в тексте)

В части клеток метка полностью отсутствовала, в другой части клеток включение предшественника происходило только в эухроматин аутосом, в ядрах третьего типа все ядро метилось сплошь и, наконец, в части ядер включение происходило только в гетерохроматиновый блок половых хромосом. Поскольку семенники у самцов этого вида состоят из группы фолликулов, в которых сперматоциты объединены в цисты с синхронным прохождением мейоза, удалось показать, что четвертый тип мечения соответствует наиболее поздним стадиям S-периода.

В последующие годы получен огромный объем экспериментальных данных, позволяющих сделать общий вывод о том, что в гетерохроматиновых районах хромосом завершение репликации ДНК задержано.

Некоторые авторы даже предполагают, что поздний синтез ДНК является единственным константным признаком гетерохроматина, известным до сих пор. Однако существуют и исключения: у некоторых видов мхов-печеночников, включая род *Pellia*, на представителях которого Э. Хайц в 1928 г. описал гетерохроматин, обнаруживающий к тому же С-окраску, гетерохроматиновые районы завершают репликацию рано. Полагают, что время репликации ДНК в районах конститутивного гетерохрома-

тина может зависеть от того, когда он декомпактизуется в интерфазе. Например, у ряда печеночников гетерохроматин компактен в G_1-периоде, но становится диффузным с началом S-периода. К середине S-периода репликация в нем завершается и он опять становится компактным.

По результатам анализа данных о расписании репликации ДНК у дрожжей сделан вывод о том, что порядок включения разных ориджинов репликации, в том числе и тех, которые находятся в гетерохроматине, точно регулируется в течение S-фазы. Он контролируется структурой хроматина, системами контроля стадий проверки (checkpoint control) и регуляции пула предшественников синтеза ДНК, а также специфичными циклин-зависимыми киназами [Wintersberger, 2000]. Можно полагать, что вышеперечисленные характеристики различны для эу- и гетерохроматина.

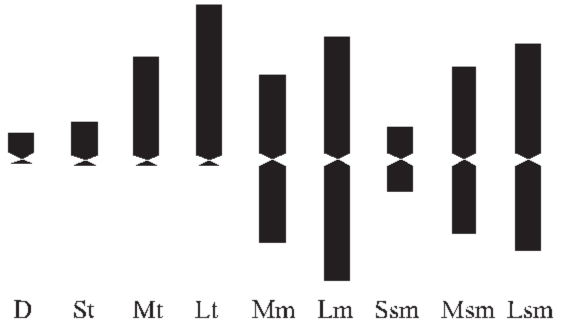
9.5.7. Варьирование количества гетерохроматина

В 1929–1937 гг. в работах Лэйнсфилда и Добржанского была открыта еще одна особенность гетерохроматина — варьирование его количества в геноме. Например, у *Drosophila pseudoobscura* *Y*-хромосома в разных популяциях представлена в 7 вариантах, сильно различающихся по длине.

Замечательны различия в размерах точечной четвертой хромосомы у *D. kikkawai* (рис. 9.29).

У насекомых обнаружены значительные вариации в размерах *X*-, *Y*-хромосом и микрохромосом, которые обогащены гетерохроматином. С помощью специфических окрасок показано, что варьирующей компонентой является именно гетерохроматин.

Рисунок 9.29



Разные типы четвертой микрохромосомы *D. kikkawai*, встречающиеся в естественных популяциях [Baimai et al., 1986. — Из: Жимулёв, 1993. С. 37]

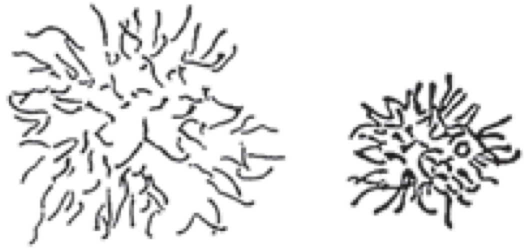
9.5.8. Формирование гетерохроматиновых районов хромосом в онтогенезе

Исследования А. А. Прокофьевой-Бельговской, проведенные в начале 1960-х гг. на ряде объектов (рыбы, амфибии, млекопитающие), привели ее к выводу о том, что в раннем развитии метафазные хромосомы значительно отличаются по морфологии от метафазных хромосом более поздних стадий: они тоньше, сильно декомпактизованы, в них не видны блоки гетерохроматина. Она назвала такие хромосомы ювенильными (рис. 9.30).

У всех организмов, хорошо изученных на стадиях раннего эмбриогенеза, — циклоп, лосось, форель, вьюн, ряд амфибий, мышь — интерфазные ядра самых первых делений дробления обладают примечательными особенностями. На стадии двух-четырех бластомеров они представляют собой пузырьки неправильной формы с прозрачной кариоплазмой, гетерохроматиновые районы в них не обнаруживаются. Все участки хромосом в этих ядрах деспирализованы, ядрышко отсутствует. На стадии метафазы хромосомы выглядят как тонкие нитеобразные структуры. Последовательные деления бластомеров сопровождаются постепенным структурированием ядра, развитием ядрышка; хромосомы в метафазе приобретают свойственную данному виду морфологическую структуру (см. рис. 9.25). В составе гетерохроматина на этих стадиях развития выявляются главным образом гистоны, а вот негистоновые белки не обнаружены [Прокофьева-Бельговская, 1986].

Хорошо изучено раннее развитие у дрозофилы до стадии бластулы (бластодермы). После оплодотворения происходит восемь быстрых синхронных делений ядер, которые затем начинают мигрировать к поверхности

Рисунок 9.30



Хромосомы лосося *Salmo salar* [Прокофьева-Бельговская, 1960. Рис. 2].
Слева — метафаза третьего деления дробления; справа — метафаза из поздней бластулы

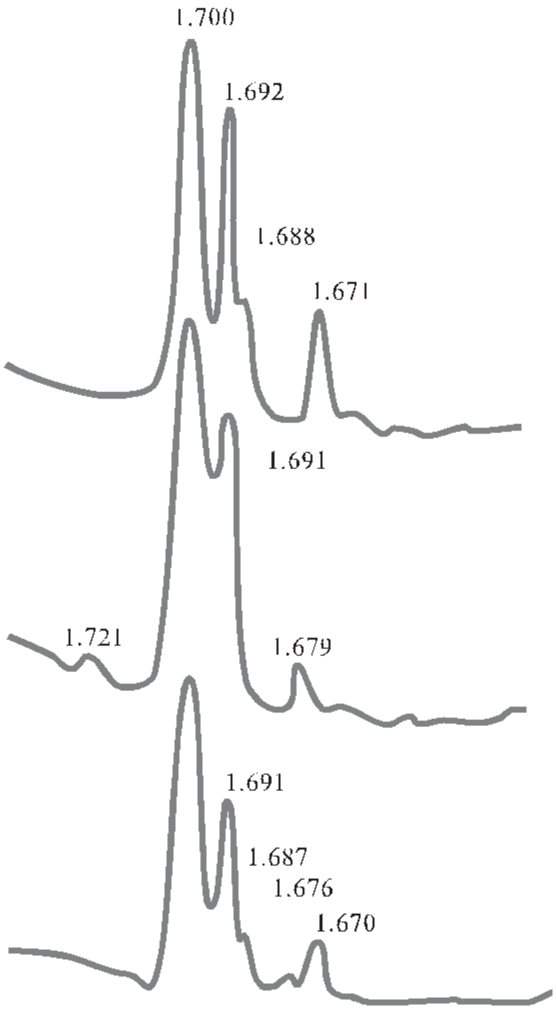
яйца, продолжая делиться. Уже около поверхности проходят еще 4 деления (циклы 10–13), в результате чего образуется синцитий из одного слоя ядер. После образования клеточных оболочек вокруг ядер в интерфазе 14-го цикла формируется клеточная бластодерма.

Клеточные деления дробления проходят очень быстро. Один митотический цикл протекает в среднем за 10 мин. Начиная с 12-го деления длительность каждого цикла увеличивается: до 12,4 мин — в 12-м, до 21,1 мин — в 13-м. В первых 11–12 делениях в ядрах не выявляются ядрышки и хромоцентры, хроматин представлен тонкодисперсной сетью, а в митотических хромосомах нет дифференциации на эу- и гетерохроматин.

Как ядрышки, так и хромоцентры появляются на стадии бластодермы. При трансплантации ядер бластодермы в неоплодотворенное яйцо хромоцентры и ядрышки в них быстро исчезают, хроматин превращается в тонкодисперсную сеть и уже через 15 мин вновь начинаются деления дробления.

При окраске на С-гетерохроматин метафазные хромосомы первых 4–5 циклов деления (30–60 мин после оплодотворения) отличаются от таковых на стадии бластодермы или от хромосом нейробластов. Они имеют вид длинных тонких слабоконденсированных нитей. В кариотипе достаточно четко окрашивается только *Y*-хромосома, в прицентромерных районах других хромосом видны лишь следы окрашивания. Специфический для гетерохроматина белок HP1 до 5–6 циклов дробления в ядрах не обнаруживается. Он начинает надежно выявляться с 10–11 цикла. В это же время в хромосомах начинается транскрипция. Таким образом, стадия бластодермы является критической: в это время активируются гены и одновременно хромосома дифференцируется на эу- и гетерохроматин.

Рисунок 9.31



Распределение фракций ДНК из генома *Drosophila virilis* (вверху), *D. americana* (в центре) и их гибрида (внизу) в градиенте плотности нейтрального CsCl [Gall, Atherton, 1974. — Из: Жимулёв, 1993. С. 46]

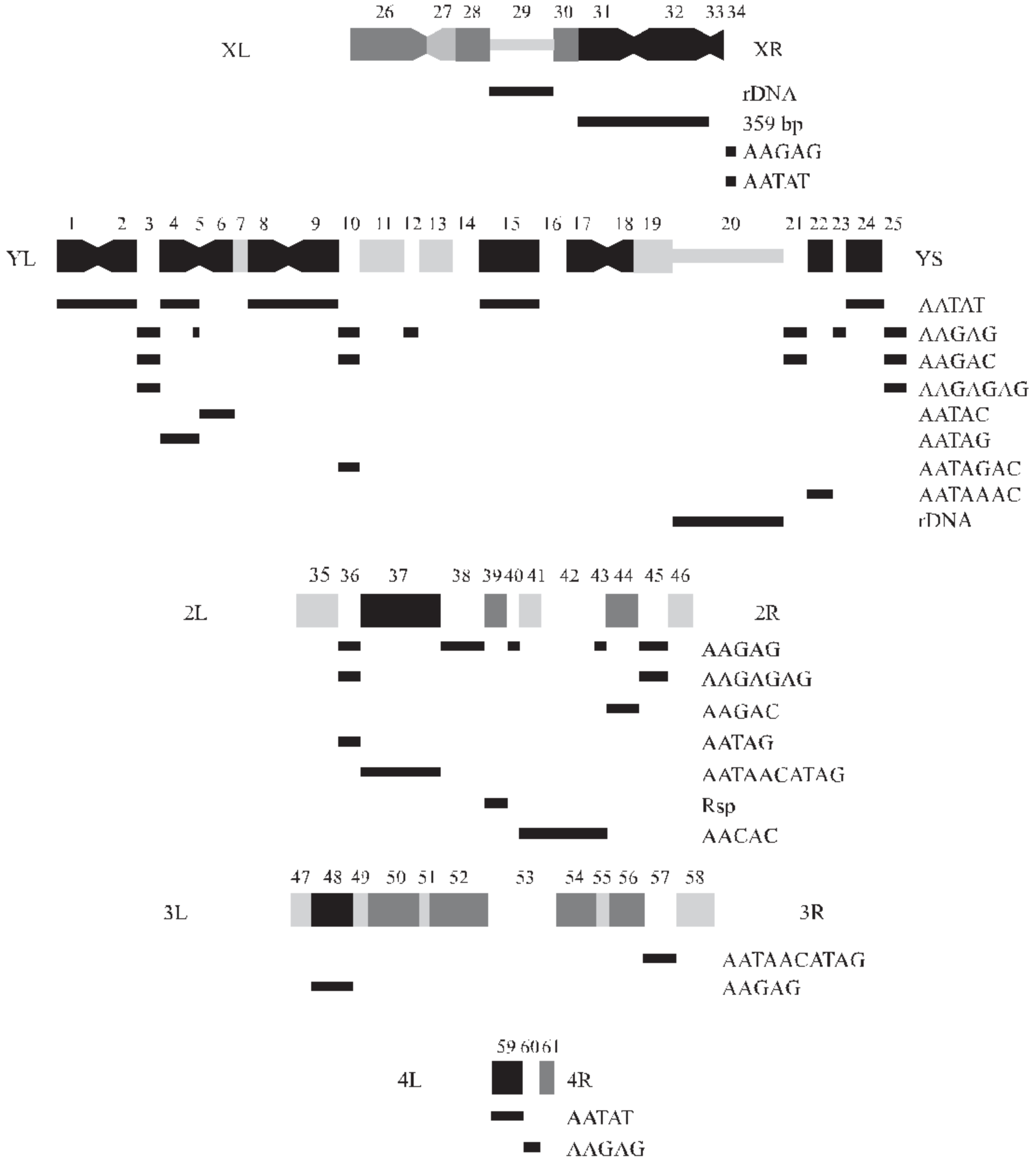
9.5.9. Повторенные последовательности

У эукариот существенная часть генома представлена короткими многократно повторенными последовательностями, состав оснований которых отличается от среднестатистического состава нуклеотидов основной части генома. Повторенные последовательности ДНК могут быть обнаружены или по их исключительно высокой скорости ренатурации, или при градиентном центрифугировании в хлористом цезии. В последнем случае основная часть ДНК составляет главную полосу осаждения (главный пик), а повторенная фракция в силу обогащенности определенным набором нуклеотидов и, следовательно, другой молекулярной массы — одну или несколько дополнительных (сателлитных) полос (рис. 9.31).

Все данные, полученные до сих пор с помощью гибридизации *in situ*, свидетельствуют о том, что сателлитная ДНК располагается в участках прицентромерного гетерохроматина в метафазных хромосомах и в хромоцентрах интерфазных ядер. Очень редко некоторое количество сателлитных последовательностей локализуется в эухроматине.

Кроме сателлитов в прицентромерном гетерохроматине располагаются умеренные повторы генов рибосомной ДНК. Анализ высокоповторенных ДНК дрозофилы позволяет разбить их на три группы в соответствии с со-

Рисунок 9.32



Локализация различных сателлитов в гетерохроматине митотических хромосом *D. melanogaster* [Zhimulev, 1998. P. 52].

Окрашенные блоки представляют участки гетерохроматина. Цифрами над хромосомами обозначены отдельные районы, выявляемые с помощью различных дифференциальных окрасок. Горизонтальными линиями под хромосомой обозначена локализация определенного сателлита, последовательность нуклеотидов показана справа

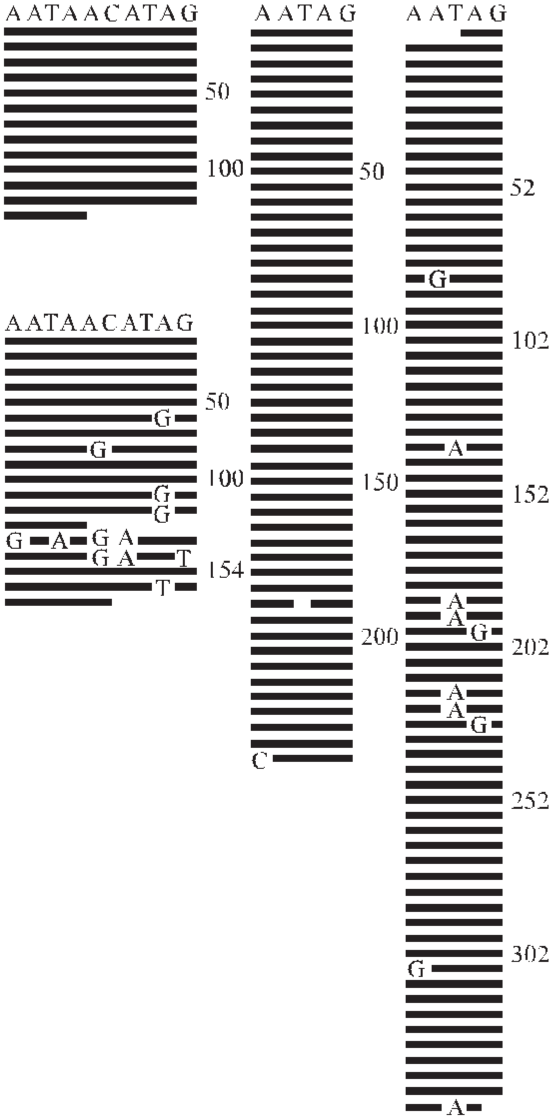
ставом нуклеотидов и степенью повторенности: 1) фракция, осаждающаяся в зоне 1,679 г/см^3 и состоящая из последовательностей рибосомной ДНК; 2) сателлиты, состоящие из повторов 5–10 пн; 3) сателлит, осаждающийся в зоне 1,688 г/см^3 — тандемный повтор длиной 359 пн.

При клонировании коротких (300–600 пн) фрагментов, выделенных из различных трактов сателлитных ДНК у дрозофилы, с последующим определением последовательностей нуклеотидов установлено:

1. В состав сателлитной ДНК входит 11 типов повторов, четыре из них мажорные и семь — минорные.

2. Как правило, большинство типов повторов присутствуют в каждой хромосоме, однако есть и специфичные для определенных хромосом, например сателлит 359 пн (рис. 9.32).

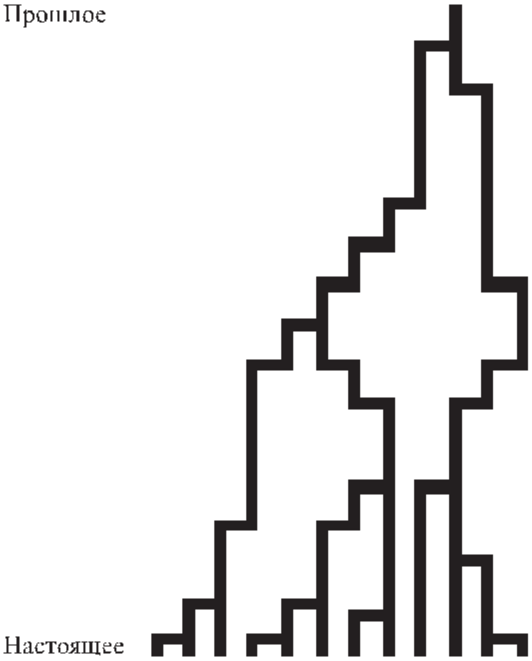
Рисунок 9.33



Нуклеотидный состав разных клонов ДНК, выделенных из сателлитов [Lohe, Brutlag, 1987. — Из: Жимулёв, 1993. С. 51].

Каждая горизонтальная полоса представляет копию повтора. Если есть замены, то указан новый нуклеотид в данном положении

Рисунок 9.34



Линейная передача *Y*-хромосомы у человека [Jobling, Tyler-Smith, 1995].

В каждом поколении часть *Y*-хромосом данной популяции передается следующему поколению (темные полосы), а другая часть — нет (светлые полосы)

3. Как правило, нуклеотидный состав повторов гомогенен, единичные замены встречаются на тысячу пар нуклеотидов, хотя в некоторых случаях частота замен может быть в 100 раз выше (рис. 9.33).

4. Среди сателлитных последовательностей часто располагаются мобильные элементы (т. е. умеренные повторы).

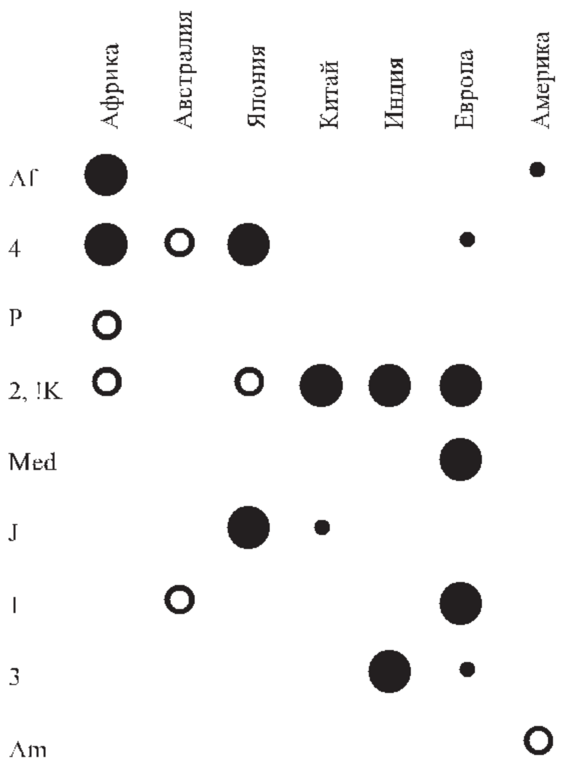
Высокоповторенные последовательности, как полагают, являются наиболее непостоянными частями генома. Сателлитные профили даже у очень близких видов сильно различаются (см., например, рис. 9.31). У *D. virilis* 40 % ДНК приходится на долю сателлитных последовательностей, у *D. texana* — 35 %, но с другими константами седиментации, у *D. ezoana* совсем не найдено сателлитов.

У дрозофил существенную часть ДНК гетерохроматина составляют мобильные элементы. Они занимают участки, характерные для каждого семейства мобильных элементов, и эти участки идентичны в различных линиях дрозофил [Dimitri, Junakovic, 1999].

Y-хромосома у многих животных, в том числе у дрозофилы, млекопитающих и человека, состоит главным образом из повторенных последовательностей (см. рис. 9.32). Эта хромосома наследуется только от отца к сыну и не претерпевает рекомбинации в мейозе. Поэтому все индивидуальные изменения структуры уникальных и повторенных последовательностей как бы запечатлевают историю происхождения именно этой *Y*-хромосомы, присутствующей именно у данной конкретной особи мужского пола.

На рис. 9.34 показано, каким образом может передаваться *Y*-хромосома потомкам в поколениях. Достаточно очевидно, что все современные *Y*-хромосомы происходят от единст-

Рисунок 9.35



Встречаемость некоторых гаплотипов *Y*-хромосомы человека в различных популяциях [Jobling, Tyler-Smith, 1995].

По вертикали — гаплотипы: Af — африканский, P — тип пигмеи, !K — !Кунг, Med — средиземноморский, J — японский, Am — американо-индейский. Большой черный кружок — широкое распространение данного гаплотипа в популяции, маленький черный кружок — редкая встречаемость гаплотипа в популяции, белый кружок — встречаемость у отдельных особей

венного предка мужского пола. Такой вывод неизбежен, хотя неясно, каким был этот предок: по историческим критериям совсем недавно существовавшим и похожим на современного человека или же древним, доисторическим.

Y-хромосомы в разных популяциях могут иметь различные отклонения в молекулярной структуре: инсерции, делеции, дупликации, инверсии, изменения в последовательностях крупных и мелких сателлитов, микросателлитов, изменения длины рестрикционных фрагментов. Существенным является использование микросателлитов в различных видах генетического анализа. Это, как правило, очень короткие (2–5 пн) тандемные повторы, разбросанные по геному эукариот. Число копий таких повторов в каждом из участков их локализации варьирует. Например, в интроне псевдогена η-глобина человека находится пять повторов последовательности ATGT, в то время как в аналогичном районе генома шимпанзе или гориллы — 4, у орангутана, гиббона и многих других обезьян имеется только по одному повтору [Messier et al., 1996]. Комбинация всех выявленных особенностей (полиморфизмов) дает гаплотип. Наиболее вариабельные полиморфизмы позволяют различать *Y*-хромосомы. Менее вариабельные признаки позволяют находить что-то общее для объединения хромосом в группы. На сегодняшний день известно 9 гаплотипов *Y*-хромосомы человека. Они поразному представлены в популяциях (рис. 9.35).

9.5.10. Генетическое содержание гетерохроматиновых районов хромосом

Еще Э. Хайц в 1929–1933 гг., имея в виду различия в степени компактизации эухроматина и гетерохроматина, по аналогии с компактными генетически неактивными митотическими хромосомами предположил, что гетерохроматин генетически неактивен. Его цитологические воззрения уже тогда противоречили генетическим данным: в 1916 г. К. Бриджес установил, что в случае нерасхождения хромосом в мейозе получались самцы без *Y*-хромосомы (*XO*), которые были полностью жизнеспособными, но стерильными. Таким образом было показано, что гетерохроматиновая *Y*-хромосома несет факторы, отвечающие за плодовитость.

В начале 30-х гг. в результате локализации генов *X*-хромосомы на цитологической карте с помощью хромосомных перестроек было показано, что фактически вся генетическая карта этой хромосомы (исключая локус *bobbed*) разместилась в эухроматине (рис. 9.36). Это с определенностью свидетельствовало о значительной генетической инертности гетерохроматина. Однако Дж. Шульц (J. Schultz) в 1941 г. установил, что утеря блоков гетерохроматина у дрозофилы летальна, а значит, там имеются гены.

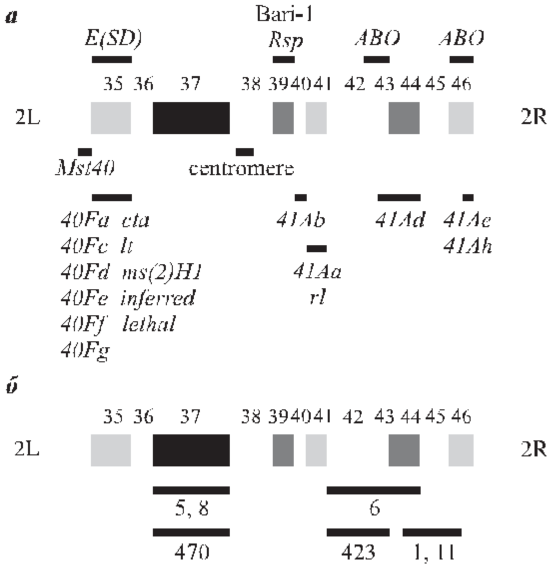
Эти противоречия были разрешены только в 80-х гг, главным образом, в связи с появлением многочисленных хромосомных перестроек, легко картируемых с помощью дифференциальных окрасок, а также с разработкой высокоразрешающих методик гибридизации *in situ*. К настоящему времени хорошо изучено генетическое содержание гетерохроматина *X*-, *Y*-хромосом и аутосом у разных видов дрозофил, в первую очередь у *D. melanogaster*.

В гетерохроматиновых областях второй хромосомы, ограниченных делециями прицентромерного гетерохроматина, было выявлено 113 мутаций, которые после комплементаци-

Рисунок 9.36

Сопоставление генетической карты *X*-хромосомы *D. melanogaster* с распределением эухроматина и гетерохроматина в митотической хромосоме [Muller, Painter, 1932]

Рисунок 9.37



Генетические локусы в гетерохроматине второй хромосомы *D. melanogaster* [Из: Zhimulev, 1998. P. 61]:

а — гены, выявленные в опытах по «насыщению» гетерохроматина мутациями; *б* — локализация инсерций *P*-элементов. 2L и 2R — левое и правое плечи второй хромосомы. 35–46 — номера фрагментов гетерохроматина, выделяемых с помощью различных дифференциальных окрасок

Рисунок 9.38

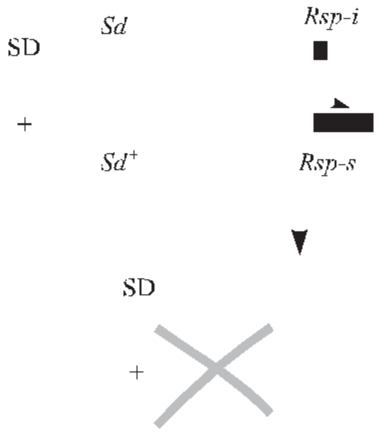


Схема взаимодействия генов в системе *Sd–Rsp* [Doshi et al., 1991. — Из: Zhimulev, 1998. P. 63].

Стрелка соединяет взаимодействующие аллели двух генов

онного анализа распределились в 13 локусах. Несколько генов в гетерохроматине второй хромосомы были известны ранее, т. е. всего было обнаружено 18 генов (рис. 9.37).

Эти результаты показывают, насколько гетерохроматин обеднен генами: частота встречаемости их на единицу длины ДНК в гетерохроматине второй хромосомы составляет примерно 1 % от таковой для эухроматина.

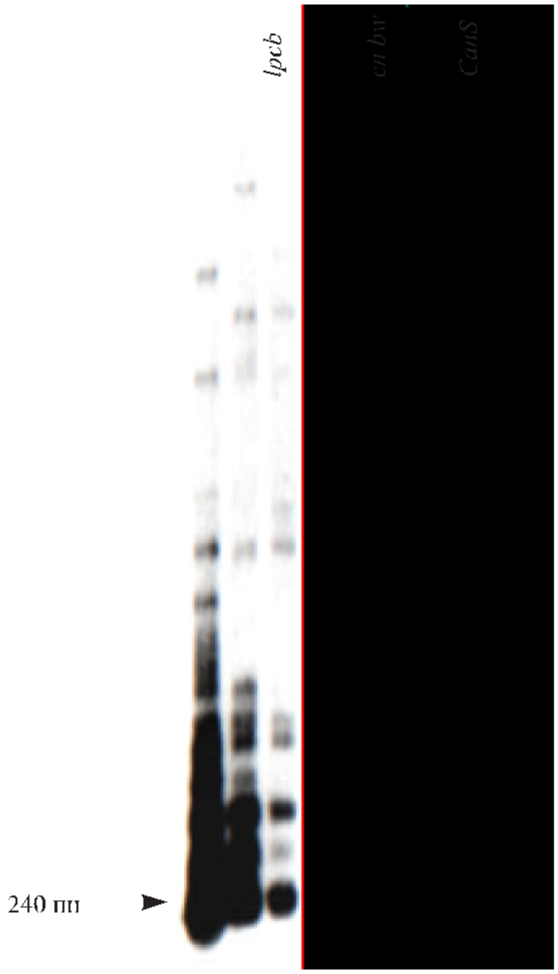
В третьей хромосоме с помощью аналогичных экспериментов выявлено 12 генов, а значит, плотность генов в гетерохроматине в этой хромосоме примерно такая же, как и во второй.

Несколько генов из гетерохроматиновых районов второй хромосомы были клонированы и охарактеризованы: например, ген *rolled* кодирует белок, гомологичный митоген-активируемой протеинкиназе, ген *concertina* кодирует альфа-субъединицу G-протеина, играющего роль в межклеточных коммуникациях в ходе эмбрионального развития.

Представляет интерес система взаимодействующих локусов *SD–Rsp*, из которых *Rsp* расположен в гетерохроматиновой секции h39 второй хромосомы (см. рис. 9.37).

В левом плече эухроматиновой части второй хромосомы был обнаружен ген *SD* (segregation distortion), мутация которого у гетерозиготных самцов Sd/Sd^+ приводит к существенному сдвигу в числе гамет, имеющих аллель *Sd*, по сравнению с числом гамет Sd^+. С помощью электронной микроскопии установили, что формирование гамет Sd^+ у особей с генотипом Sd/Sd^+ нарушено из-за сильной декомпактизации хроматина. Как выяснилось, ген *Sd* взаимодействует с геном *Rsp*, расположенным в гетерохроматине. Известны два аллеля *Rsp-i* (insensitive) и *Rsp-s* (sensitive). Линии с нарушенным расщеплением гамет имеют генотип *Sd*, $Rsp\text{-}i/Sd^+$, *Rsp-s* (рис. 9.38).

Рисунок 9.39



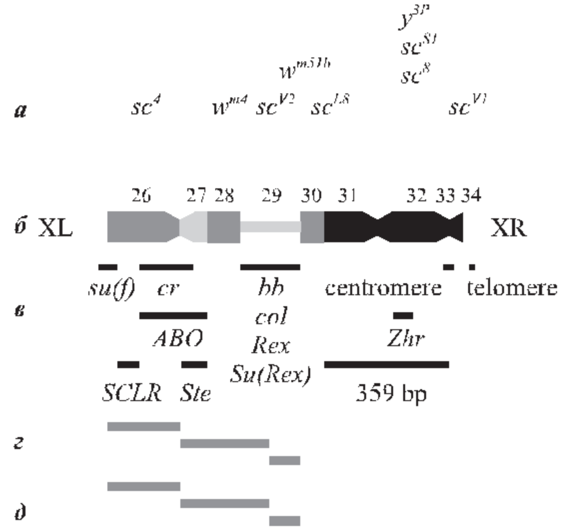
Варьирование числа копий *Rsp*-повтора в линиях *D. melanogaster* [Wu et al., 1988. — Из: Zhimulev, 1998. P. 64].

ДНК, расщепленная рестриктазой *Xba*I, из линий *supersensitive* (*lpcb*), *sensitive* (*cn*, *bw*) и частично чувствительной (*Canton-S*) гибридизовалась с радиоактивно меченым клоном ДНК, содержащим *Xba*I-повтор

Оказалось, что локус *Rsp* является районом повторенной ДНК, где единицей повтора служит фрагмент в 120 пн. Этот фрагмент обогащен нуклеотидами А и Т, имеет общую структуру сателлитной ДНК и организован как димер, ограниченный с обоих концов последовательностью TCTAGA (сайт рестрикции эндонуклеазы *Xba*I). В целом в линии *sensitive* на локус *Rsp* приходится около 600 тпн. Хромосома с аллелем *Sd* имеет делецию района *Rsp* и менее 20 копий *Xba*I-сателлита. *Rsp-ss* (super sensitive) может иметь 3000 и более копий (рис. 9.39).

Другой ген этой системы — *Sd*, расположенный в эухроматиновом районе 37D5, картируется в *Eco*RI-фрагменте длиной 7 тпн, с которого считывается транскрипт длиной 4 тпн.

Рисунок 9.40



Функциональные сайты в гетерохроматине *X*-хромосомы *D. melanogaster* [Zhimulev, 1998. P. 58]:

а — точки разрывов инверсий; *б* — цитологическая карта гетерохроматиновых блоков (26–34); *в* — картирование функциональных сайтов; *г* — районы, модифицирующие эффект положения; *д* — районы, влияющие на эндорепликацию рДНК в клетках слюнных желез личинок

Согласно представлениям некоторых авторов, ген *Sd* кодирует белок, обладающий высокой способностью связываться с ДНК повтора *Rsp*. У клеток Sd^{+}, *Rsp-s* много *XbaI*-сателлитной ДНК и недостаточно белков SD, связывающихся с ней и компактизующих ее в ходе спермиегенеза, в результате чего гаметы с генотипом Sd^{+}, *Rsp-s* гибнут.

Цитогенетические карты гетерохроматина *X*- и *Y*-хромосом представлены на рис. 9.40 и 9.41.

Приведем краткие характеристики некоторых генов, расположенных в гетерохроматине *X*- и *Y*-хромосом.

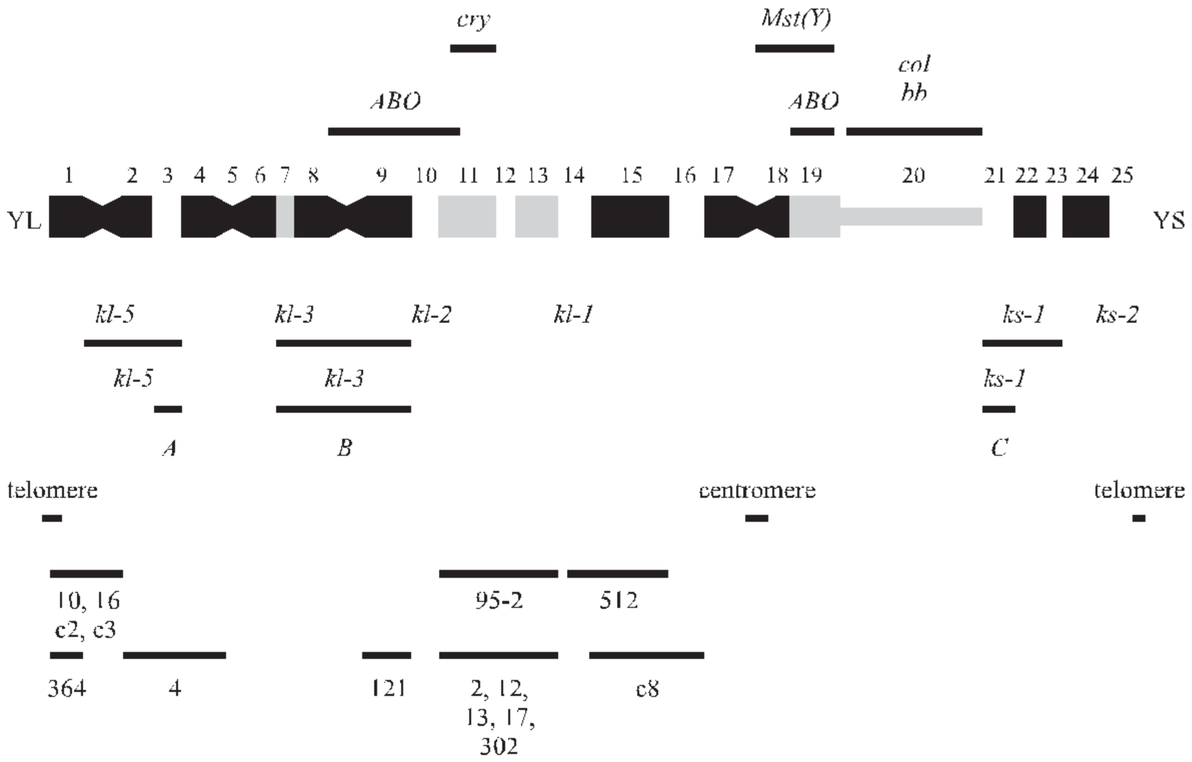
bb (bobbed) — участки локализации генов, повторенных 150–250 раз и кодирующих рибосомную 18S и 28S РНК.

cr (compensation response) — увеличивают политенизацию генов рДНК при потере одного из гомологов.

abo/*ABO*-система (abnormal oocyte) — возможно, контролирует количество рибосомной РНК в клетке.

Rex (ribosomal exchange) — локус, индуцирующий митотический обмен между двумя кластерами рДНК.

Рисунок 9.41



Карта *Y*-хромосомы *D. melanogaster* [Zhimulev, 1998. P. 62].
kl, *ks* — факторы фертильности самцов; *A*, *B*, *C* — сайты формирования петель в сперматоцитах; 10, 16, 95-2 и ниже — участки встраивания *P*-элементов

cry (*crystal*) / *Ste* (*Stellate*) — система взаимодействующих генов. *Ste* локализован в середине эухроматиновой части *X*-хромосом, *cry* (или по-другому — *Su(Ste)*) — в блоке h11 *Y*-хромосомы. Самцы *cry, Ste* стерильны. На молекулярном уровне *cry* — это 80-кратный повтор элемента ДНК, ограниченного сайтами рестрикции *Cfo*I и имеющего длину около 800 пн. Участок *Ste* имеет частичную гомологию с *cry* и также является повтором: 200 копий у *Ste* и ~20 копий у Ste^+. Третий сайт локализации повтора *Ste* приходится на гетерохроматин *X*-хромосомы. Присутствие нормального аллеля *cry* ингибирует накопление РНК Ste^+. Удаление *Y*-хромосомы ведет к сверхпродукции РНК Ste^+. По-видимому, *cry* контролирует активность Ste^+.

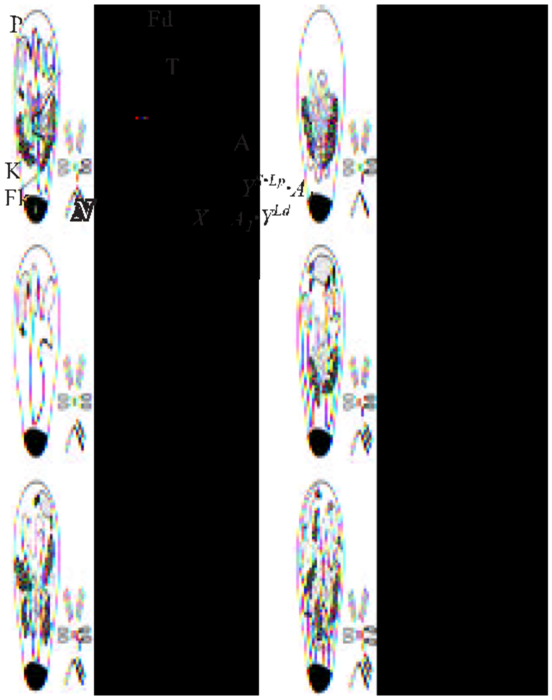
В начале 1960-х гг. Г. Мейер, О. Хесс и В. Беерманн описали особые стадиеспецифичные нитеподобные структуры («петли») в ядрах сперматоцитов *D. melanogaster*. Через несколько лет пришло понимание того, что «петли» — это декомпактизованные участки *Y*-хромосомы. На них синтезируется РНК и накапливаются белки. Каждая петля уникальна, так как имеет определенные размеры и морфологию. У самцов *X0* этих петель нет, зато у самцов *XYY* они присутствуют в двойном количестве. Если произошла дупликация какого-то участка *Y*-хромосомы, какая-то из петель будет также дуплицирована (рис. 9.42). Петли связаны с функциями плодовитости самца, потеря любой из них приводит к стерильности. Обнаружено семь петель, что примерно соответствует числу генов фертильности (7–16). Функция одного из этих генов выяснена: ген *kl-5* контролирует формирование наружных микротрубочек хвоста сперматозоида.

Общая длина петель у другого вида — *D. hydei* доходит до 1000 мкм, или 1/12 всей длины ДНК в *Y*-хромосоме. Функции остающихся 11/12 неизвестны. Гены фертильности имеют громадную длину: до 4000 тпн. В их состав входит большое количество сателлитной ДНК, не кодирующей полипептиды.

Y-хромосома *D. hydei* содержит 2 типа ДНК:

1) *Y*-специфические, сателлитоподобные последовательности, которые встречаются только в этой хромосоме и располагаются семействами по 200–2000 копий в виде тандемных повторов;

Рисунок 9.42



Варьирование числа и морфологии петель у *D. hydei* в линиях с транслокациями между *Y*-хромосомой и аутосомой [Hess, 1965. — Из: Zhimulev, 1998. P. 70].

А — аутосома, нормальный партнер хромосомы с транслокацией; $Y^{S.Lp}{\cdot}A_l$ — длинный и $A_l{\cdot}Y^{Ld}$ — короткий элементы транслокации; Fd, Fk, P, T, K — петли; N — ядрышко

Рисунок 9.43

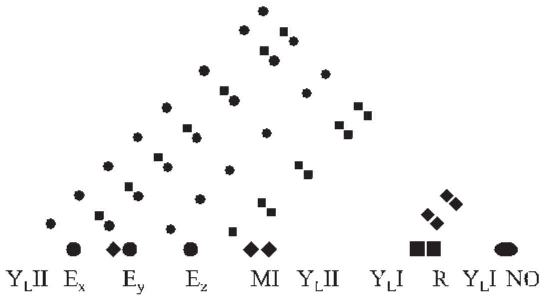


Схема молекулярно-генетической организации петли *thread* у *D. hydei* [Hackstein, Hochstenbach, 1995].

Различными символами внизу показаны семейства последовательностей ДНК: Y_LI и Y_LII — большие семейства повторов, R — семейство *rally*, MI — ретротранспозон *micropia*, E — предполагаемые экзоны гена, кодирующего тяжелую β-цепь динеина, NO — ядрышковый организатор. Направление транскрипции слева направо

2) *Y*-связанные повторы, которые встречаются как в этой, так и в других хромосомах и являются, как правило, мобильными элементами генома.

Каждая петля представляет собой гигантский транскрипт, содержащий главным образом повторенные последовательности ДНК — сателлиты, дефектные и нормальные мобильные элементы.

В одной из петель у *D. melanogaster*, длина которой составляет около 1300 тпн, расположен ген *kl-5.* Длина экзонов гена составляет примерно 14 тпн, и эти экзоны находятся среди сателлитов AAGAG и AAGAC и мобильных элементов.

В другой петле, *thread* у *D. hydei*, расположен ген фертильности *A*. В пределах петли (рис. 9.43) блок гомогенных повторов Y_LI длиной в 1,5 млн пн прерывается блоками повторов, называемых *rally* (всего 400 тпн). Оставшаяся часть транскрипта состоит из повторенных ретротранспозонов из семейства *micropia* и повторов Y_LII.

Петли очень активны в транскрипции: около 50 % включения ^{3}H-уридина в ядро приходится на *Y*-хромосому, оставшиеся 50 % — на все остальные хромосомы.

Огромные массы белков, кодируемых генами, расположенными в различных (не *Y*) хромосомах, накапливаются на петлях.

Согласно современным представлениям, петли:

1) регулируют развитие сперматид;

2) связывают большие массы белков, необходимых для формирования сперматоцитов;

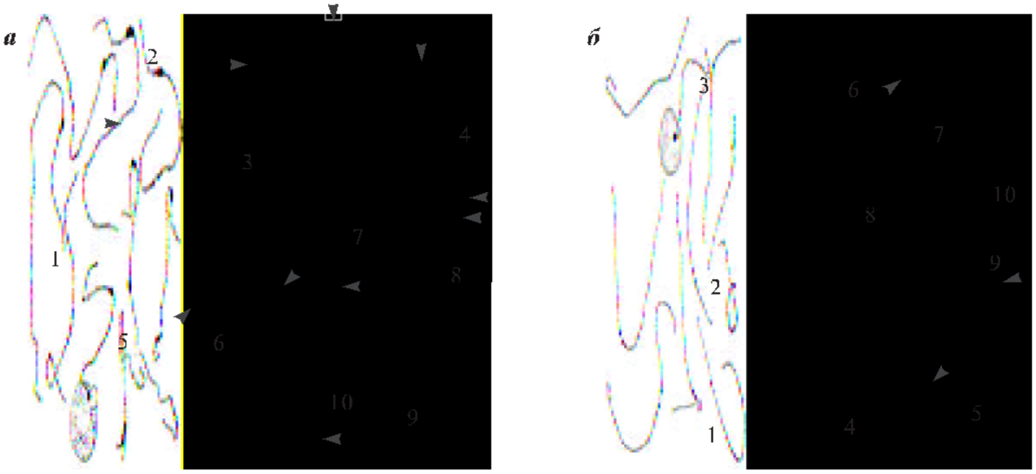
3) существуют для образования необычно длинного хвоста сперматозоида.

9.5.11. *Интеркалярный гетерохроматин в пахитенных хромосомах кукурузы*

Б. МакКлинток в 1929 г. обнаружила гетерохроматиновые узелки — темноокрашенные гетеропикнотические утолщения в хромосомах материнских клеток пыльцы на стадии пахитены (рис. 9.44). Размеры узелков — 0,3–3,3 мкм.

Каждая из хромосом имеет несколько фенотипических вариантов, различающихся по числу узелков, их размерам и положению. В пределах одного растения положение каждого из узелков константно, однако полиморфизм между популяциями очень сильно выражен. В разных популяциях обнаружено 29 районов, в которых формируются узелки. Расположены они, как правило, в дистальных частях всех хромосом. В митотических хромосомах корне-

Рисунок 9.44



Наборы пахитенных хромосом в многоузелковой (*а*) и малоузелковой (*б*) линиях кукурузы [Похмельных, 1974].
Узелки указаны стрелками

вой меристемы в многоузелковой линии с помощью С-окраски выявляются типичные гетерохроматиновые участки, интеркалированные в эухроматиновые плечи хромосом [Похмельных, 1974].

В основе структуры ДНК в узелках лежат тандемные повторы фрагмента длиной 180 пн. Такие повторы не обнаружены в районах прицентромерного гетерохроматина и в ядрышковом организаторе. Тракты из повторов по 180 пн прерываются инсерциями ретротранспозонов. В узелке хромосомы IX кукурузы до 30 % ДНК представлено копиями этого ретротранспозона. Кроме того, обнаружены еще тракты тандемных повторов TR1, имеющих длину 350 пн [Ananiev et al., 1998].

* * *

Из анализа всех приведенных фактов довольно очевидно, что эухроматин и гетерохроматин сильно различаются по молекулярной и генетической организации слагающей их ДНК (табл. 9.2).

Встает вопрос о функциях эу- и гетерохроматина. Если в отношении эухроматина все довольно очевидно — в нем содержится основная часть генов, необходимых для развития организма и жизнедеятельности клеток, то вопрос о функциональной значимости гетерохроматина до сих пор остается предметом споров и фантазий ученых. К настоящему времени довольно трудно найти разумные объяснения существования гетерохроматина. Можно попытаться лишь указать на ту область, где эти объяснения следует искать. Кажется уместным привести следующие соображения:

1. Гетерохроматин присутствует в геномах подавляющего большинства видов, что косвенно свидетельствует о его необходимости.

2. Последовательности ДНК, составляющие гетерохроматин, в ходе онтогенеза могут легко теряться из ядер соматических клеток, например, при политенизации хромосом у дрозофилы, диминуции хроматина аскарид или циклопов, созревании макронуклеуса у инфузорий и т. д. Однако в клетках зародышевого пути эти последовательности ДНК в количествах, характерных для данного вида, всегда присутствуют.

3. Те немногие гены, которые найдены в гетерохроматине, чаще всего связаны с какими-то функциями в клетках зародышевого пути, например, нужны для созревания гамет. Некоторые последовательности ДНК, расположенные в гетерохроматине, необходимы для осуществления функций в ходе мейоза, например для спаривания половых хромосом в профазе.

Все это указывает на то, что гетерохроматин имеет особое значение в жизни клеток зародышевого пути.

Литература к разделу 9.5

Жимулёв И. Ф. Молекулярная и генетическая организация гетерохроматина в хромосомах дрозофилы // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 2. С. 76–82.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 490 с.

Похмельных Г. А. К вопросу о природе узелковых гетерохроматических районов хромосом кукурузы. I. Сравнительное изучение структуры хромосом соматических клеток, окрашенных

красителем Гимза, и пахитенных хромосом многоузелковой линии кукурузы // Генетика. 1974. Т. 10, № 6. С. 14–24.

Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.

Ananiev E. V., Phillips R. L., Rines H. W. Knob associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 10785–10790.

Dimitri P., Junakovic N. Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15, № 4. P. 123–124.

Hackstein J. H. P., Hochstenbach R. The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements // Trends in Genetics. 1995. Vol. 11. P. 195–200.

Hennig W. Heterochromatin // Chromosoma. 1999. Vol. 108. P. 1–9.

Heitz E. Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung // Z. Zellforsch. 1934. Bd 20. S. 237–287.

Jobling M. A., Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution // Trends in Genetics. 1995. Vol. 11. P. 449–456.

Messier W., Shou-Hsien Li., Stewart C.-B. The birth of microsatellites // Nature. 1996. Vol. 381. P. 483.

Muller H. J., Painter T. S. The differentiation of the sex chromosome of Drosophila into genetically active and inert regions // Z. Indukt. Abstamm. Vererb. 1932. Vol. 62. P. 316–365.

Wintersberger E. Why is there late replication? // Chromosoma. 2000. Vol. 109. P. 300–307.

Zacharias H. Emil Heitz (1892-1965): Chloroplast, heterochromatin and polytene chromosomes // Genetics. 1995. Vol. 141. P. 7–14.

Zhimulev I. F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation // Advances in Genetics. 1998. Vol. 37. 550 p.

Таблица 9.2. Различия свойств эухроматина и гетерохроматина в хромосомах дрозофилы

Свойство	Эухроматин	Гетерохроматин
Занимаемая доля генома	~ 67%	~ 33%
Расположение в хромосомах	Плечи хромосом	*Y*-хромосома — полностью, остальные хромосомы — в прицентромерных областях
Состояние компактности в клеточном цикле	В ходе митотического и мейотического делений	На протяжении всего клеточного цикла
Компактизующее влияние на приближенные участки хромосом (эффект положения мозаичного типа)	Не оказывает	Участки эухроматина, приближенные к гетерохроматину, также становятся компактными, а гены в них инактивируются
Способность объединяться с другими районами хромосом	Не отмечена	Гетерохроматиновые участки объединяются, образуя хромоцентры
Образование хромосомных перестроек	Обычная частота обнаружения	Повышенная частота обнаружения
Расположение в клеточном ядре	По всему объему	Главным образом на ядерной оболочке
Время синтеза ДНК в клеточном цикле	Первые 3/4 S-периода	Вторая половина S-периода. Завершение процесса репликации ДНК сильно задержано
Дифференциальная окраска специфическими красителями (С-окраска)	Отсутствие окраски	Интенсивная окраска
Фракции ДНК по степени повторенности	~ 90% уникальных последовательностей и ~ 10% — умеренно повторенных	Основная масса ДНК представлена высокоповторенными фракциями, в меньшей степени — умеренными повторами, и совсем мало уникальных последовательностей
Наличие особых компактизующих белков, например белка HP1	Почти отсутствуют	Обильно присутствуют по всему гетерохроматину
Варьирование количества материала в хромосомах	Не отмечено	Значительное в каждой хромосоме
Генетическое содержание	Основная часть всех генов генома локализована в эухроматине	Гены почти отсутствуют

9.6. ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН

9.6.1. Концепция теломеры

Три группы фактов, полученных к началу 1980-х гг., свидетельствовали о наличии на концах хромосом особых структур.

1. Цитологи, изучавшие кариотипы растений или животных, отмечали, что морфология отдельных хромосом и наборы хромосом в целом являются постоянными. Если бы была возможность хромосомам склеиваться конец в конец, такого постоянства не было бы. Значит, существует некая структура, запрещающая объединение концов.

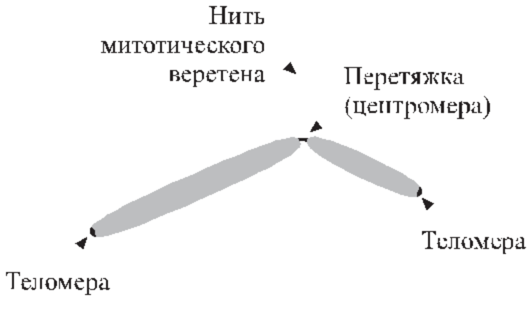
2. Г. Мёллер в 1927 г. открыл возможность получения мутаций в результате облучения клеток дрозофилы рентгеновскими лучами. При этом мутации могут быть точковыми или сопровождаться перестройками хромосом (инверсиями, транслокациями, делециями и дупликациями). Перестройки образуются в результате разрывов в различных участках хромосом и последующего воссоединения фрагментов в новом порядке.

Исследуя закономерности образования хромосомных перестроек, Г. Мёллер в 1932 г. пришел к двум важным выводам о поведении наиболее дистальных частей нормальных хромосом: 1) искусственно образовавшиеся концы фрагментов хромосом объединяются только с такими же искусственно образовавшимися и никогда — с концевыми фрагментами, существующими в нормальных хромосомах; 2) в свою очередь, концевые участки нормальных хромосом в результате облучения никогда не перемещаются во внутренние районы хромосом. Для объяснения результатов этих наблюдений Мёллер предположил, что участки хромосом (или «гены», как он их называл), расположенные во внутренних районах хромосом, обладают свойством биполярности, т. е. они могут соединяться с другими фрагментами каждым из двух своих свободных концов. Тот «ген» (или фрагмент хромосомы), который в нормальной хромосоме расположен на самом ее конце, по мнению Мёллера, униполярен, т. е. способен к объединению только с той стороны, которая обращена к внутренней части хромосомы. Мёллер предположил, что этот концевой униполярный «ген» необходим для особой функции «запечатывания конца хромосомы». Такой «ген» был назван специальным термином — «теломера» (от греч. «телос» — конец, «мерос» — часть) (рис. 9.45).

Б. МакКлинток в 1941 г. на основании полученных ею результатов по индукции хромосомных перестроек у кукурузы пришла к тем же выводам, что и Мёллер. Более того, она постулировала, что пассивность теломер в объединении с другими участками хромосом играет исключительно важную роль, поскольку предотвращает склеивание хромосом конец в конец, а это, в свою очередь, способствует сохранению их индивидуальности и всего кариотипа в целом.

3. После открытия структуры ДНК и механизмов ее репликации А. М. Оловников (рис. 9.46) в России заинтересовался загадкой

Рисунок 9.45



Теломеры на концах митотической хромосомы

Рисунок 9.46

Алексей Матвеевич Оловников
(р. 1936)

Рисунок 9.47

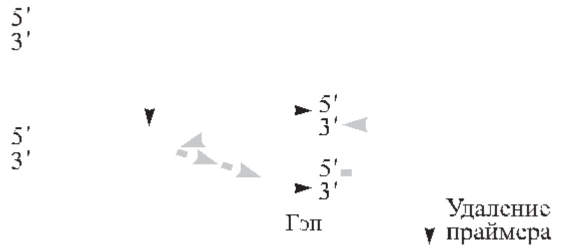


Схема недорепликации конечной части молекулы ДНК [Zakian, 1997]. Прямоугольниками на отстающей цепи изображены РНК-праймеры длиной 8–12 пн. Короткие стрелки — фрагменты Оказаки

организации репликации на конце молекулы ДНК. Дело в том, что каждая хромосома содержит единственную непрерывную молекулу ДНК, и концы этой молекулы совпадают с концами хромосомы. В соответствии со стандартной моделью репликации ДНК процесс удвоения отстающей цепи ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров, или затравок, с 3'-концов которых синтезируются отрезки ДНК — фрагменты Оказаки (рис. 9.47). Затем РНК-праймер удаляется, образовавшиеся бреши (гэпы) заполняются фрагментами ДНК. Последние синтезируются, используя в качестве праймеров 3'-концы фрагментов Оказаки. Поскольку для синтеза крайнего фрагмента нет праймера, вновь образованная цепь оказывается на 8–12 нуклеотидов (длина РНК-праймера) короче исходной. В результате после каждого цикла репликации молекула ДНК должна становиться все короче: одна из четырех цепей укоротилась на 8–12 пн, т. е. на одном из концов хромосомы средняя длина цепей ДНК (двух материнских и двух вновь синтезированных) уменьшилась на 2–3 пн.

Поэтому А. М. Оловников пришел к выводу, что если в клетке нет особых механизмов, компенсирующих потери нуклеотидов с каждого конца нити ДНК, то хромосома начнет укорачиваться: сначала должны исчезнуть теломерные районы, затем ближайшие к теломерам гены, потом более удаленные гены и т. д. Очевидно, что этот процесс должен в конце концов привести к гибели клетки.

Действительно, у клеток, например, человека, растущих в культуре (*in vitro*), есть лимит на число делений. Американским ученым Л. Хейфликом в 1965 г. было показано, что, если для культивирования взять клетки у новорожденных, они могут пройти 80–90 делений, клетки, взятые у 70-летних, делятся только 20–30 раз. Ограничение на число клеточных делений называют барьером Хейфлика. Обычно клетки не преодолевают барьер из 20–90 делений, а в среднем, по мнению Хейфлика, он составляет 50 +10. А. М. Оловников в 1971 г. предложил следующую формулу для расчета продолжительности жизни любого клона клеток *in vitro*:

$$T = k\left(\frac{lt}{lm} - n\right),$$

где T — срок предстоящей жизни клеток; k — коэффициент корреляции между сроком жизни клона клеток и числом репликаций ДНК; lt — длина теломерного участка; lm — длина фрагмента ДНК, утрачиваемого в ходе каждого цикла репликации; n — число уже прошедших репликаций.

Таким образом, Оловников напрямую связал срок жизни клеточных клонов с длиной теломерной ДНК. Далее он предположил, что «в качестве временной защиты концевых репликонов, локализующихся вблизи торцов хромосомы, клетка должна использовать телогены, которые находятся на торцах теломер», а также что «телоген, функция которого оставалась неясной, — это неинформационный ген, имеющий „буферную“ функцию и монотонную нуклеотидную последовательность... он укорачивается в митозах и тем самым защищает информационные гены от усечения при репликации» [Оловников, 1971].

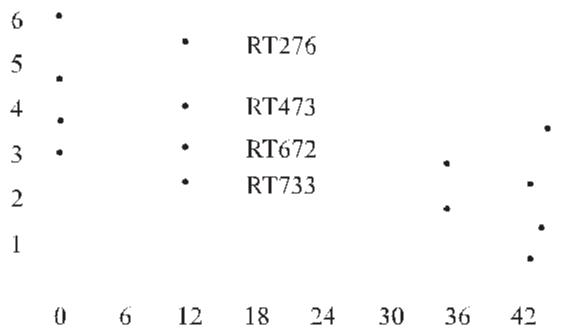
О том что укорочение концевого фрагмента ДНК реально, свидетельствуют результаты следующего опыта.

При мобилизации перемещений транспозона из теломерного района *X*-хромосомы дрозофилы в последнем обнаружены терминальные делеции, удаляющие наиболее дистальные последовательности ДНК. В следующих поколениях в линиях с такими делециями монотонно уменьшается длина концевых фрагментов ДНК (от теломеры к центромере) со скоростью 50–100 (в среднем 75) пар нуклеотидов за одну генерацию (рис. 9.48).

Полагают, что размер утрачиваемого фрагмента коррелирует с размером РНК-праймера, инициирующего синтез фрагментов Оказаки при репликации ДНК.

Если учесть, что клетки полового пути у дрозофилы в течение одного поколения делятся примерно 35 раз, совпадение расчетной длины фрагментов, утерянных за одно поколение, и экспериментальных данных оказалось поразительным. В нормальных же хромосомах, в которых теломеры присутствуют, укорочение длины молекулы ДНК не происходит.

Рисунок 9.48



Уменьшение размеров фрагмента концевой ДНК в *X*-хромосоме дрозофилы в линиях с теломерными делециями RT276, RT473, RT624 и RT733. [Biessmann, Mason, 1988. — Из: Жимулёв, 1993. С. 212].

По оси абсцисс — время с начала наблюдения (мес.), по оси ординат — размер концевого фрагмента *Pst*I в хромосомах с делециями (в тпн)

Рисунок 9.49

Елизабет Блакберн (р. 1948)

9.6.2. Строение теломер

Молекулярно-генетическое изучение теломер осложняется тем, что число их в каждой клетке невелико: по две в каждой хромосоме (другими словами, 8 теломер на $1{,}7 \times 10^8$ пн генома дрозофилы или 46 теломер на 3×10^9 пн генома человека) [Telomeres, 1995].

Подход к решению проблемы выделения теломерной ДНК был найден неожиданно. Цитологи, изучавшие развитие простейших одноклеточных животных из класса Ciliata, таких как, например, всем известная инфузория-туфелька, обнаружили у каждого организма по два ядра — микронуклеус и макронуклеус. Микронуклеус является покоящимся ядром, в котором хромосомы находятся в компактном состоянии. Он служит для передачи наследственного материала из поколения в поколение. Другое дело — макронуклеус. Это трофическое ядро. Хромосомы там находятся в активном состоянии — на них синтезируется РНК, кодирующая белки, необходимые для роста и жизнедеятельности этого одноклеточного организма. На начальных этапах развития инфузории хромосомный материал макронуклеуса испытывает серию сложных превращений. Сначала хромосомы политенизируются, т. е. каждая реплицируется примерно десять раз и все вновь образованные хромосомы остаются тесно связанными друг с другом, образуя пучок хромосом, или, как в таких случаях говорят, политенную хромосому с характерным рисунком темных хромомеров и светлых межхромомерных участков. Затем политенная хромосома как бы разрезается поперек на тысячи долек, в каждой из которых находится один или несколько хромомеров. Каждая долька одевается в особую белковую оболочку, формируя пузырек. Таким образом, на этой стадии развития созревающий макронуклеус состоит из тысяч пузырьков, в каждом из которых заключен один или несколько хромомеров. В пузырьках происходит «созревание» наследственного материала (см. разд. 7.7.3, 9.7.3): из фрагмента хромосомы удаляется и переваривается вся ДНК, не имеющая прямого отношения к кодированию наследственной информации, например, межгенные фрагменты, внутренние участки генов, не кодирующие белки (интроны), а также мобильные элементы генома. Затем пузырьки разрываются, и их содержимое выходит в полость макронуклеуса, который превращается, по образному выражению Д. Прескотта, исследователя этих процессов, в «мешок с генами». И наконец, самое важное: к каждому из этих генов присоединяется по одной теломерной последовательности с каждого конца. В итоге в макронуклеусе в общей сложности присутствует несколько миллионов теломер.

Наличие «мешка с генами», в котором находятся только индивидуальные гены, предоставляет уникальные возможности для их выделения и последующего биохимического анализа.

Таблица 9.3. Теломерные повторы в хромосомах некоторых видов [Telomeres, 1995. P. 12–13]

Таксон, виды		Последовательности нуклеотидов (5′ → 3′)
Простейшие	*Euplotes*	TTTTGGGG
Слизневые грибы	*Phusarum*	TTTAGGG
Жгутиковые	*Trypanosoma*	TTAGGG
Споровики	*Plasmodium*	TT(T/C)AGGG
Грибы	*Neurospora*	TTAGGG
	Candida maltosa	ACGGATGCAGACTCGCTTGGTGT
Нематоды	*Ascaris*	TTAGGC
Насекомые	*Bombyx mori*	TTAGG
Водоросли	*Chlamidomonas*	TTTTAGGG
Высшие растения	*Arabidopsis*	TTTAGGG
Позвоночные животные	*Homo sapiens*	TTAGGG

В 1978 г. Е. Блакберн (рис. 9.49) и Дж. Голл, выделив из макронуклеуса инфузории тетрахимены («мешка с генами») фрагмент ДНК длиной 22 тпн, содержащий два сцепленных друг с другом гена рибосомной РНК, и применив еще только набиравшую популярность методику определения последовательностей нуклеотидов в молекулах ДНК, установили, что на обоих концах этой пары генов находится относительно простая последовательность из цитидина и аденозина, а во второй цепи ДНК — соответственно гуанозина и тимидина, т. е. на концах генов была последовательность 5'-CCCCAA-3' / 3'-GGGGTT-5', повторенная несколько раз подряд. У двух других видов, *Stylonychia* и *Oxytricha*, как было показано несколько позже, они похожи: CCCCAAAA/GGGGTTTT [Telomeres, 1995].

В последние годы с помощью различных биохимических методик теломеры были выделены из ДНК многих организмов. Оказалось, что у большинства видов животных и растений теломерные районы имеют в целом очень похожее строение. Как правило, в состав теломерного района входят два типа фрагментов: собственно конечная часть хромосомы (или теломерный концевой повтор — TR) и последовательность, связанная с теломерой (TAS), которая располагается проксимальнее (рис. 9.50).

Как уже было отмечено, у инфузории тетрахимены самая концевая часть ДНК содержит многократно повторенную последовательность гексануклеотида 5'-CCCCAA-3'/5'-TTGGGG-3', при этом последовательность ориентирована так, что TTGGGG-повторы находятся на 3'-конце одной цепи ДНК, в то время как CCCCAA-повторы формируют 5'-конец другой цепи. Для удобства первую из цепей называют G-цепью, вторую — C-цепью.

К настоящему времени известно, что теломерные фрагменты у большинства живых существ очень схожи, они обогащены нуклеотидами G и C, которые располагаются в определенной, похожей у всех организмов последовательности (табл. 9.3). Несколько отличается структура TR у некоторых видов грибов и особенно сильно — у дрозофилы (см. ниже).

Кроме инфузории тетрахимены, теломерные повторы изучены у многих других представителей простейших, в том числе у стилонихии и окситрихи, у которых повторяющейся единицей является октамер 5'-CCCCAAAA-3'/3'-GGGGTTTT-5'. Этот октануклеотид расположен на концах хромосом особым образом, так что часть G-цепи ДНК остается одиночной из-за отсутствия второй цепи (рис. 9.51).

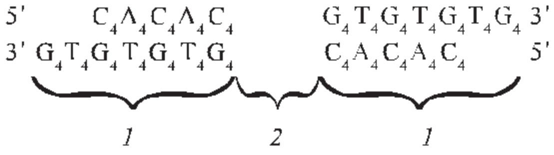
Видно, что на цепи ДНК, 3'-конец которой служит концом хромосомы, основной повторяющейся единицей является октануклеотид 5'-T_4G_4-3'. Выступающие концы нитей ДНК обнаружены в теломерах всех организмов. Этот октануклеотид, выступающий за обычную двойную уотсон-криковскую спираль, называют одноцепочечным свободным G-концом. Длина простого повторенного дуплекса, расположенного проксимальнее, может варьировать от менее чем 50 пн (у *Euplotes*) до более чем 100 тпн (у мыши). Интересно, что теломерные однонитчатые свободные G-концы фактически одинаковы у многих представителей совершенно различных филогенетических таксонов, за исключением дрожжей. Анализ показал, что четыре молекулы гуанина на выступающем конце, не имеющие возможности контактировать с молекулами цитозина, как это бывает в обычной молекуле ДНК, все же спариваются. Они располагаются в одной плоскости и образуют водородные связи между собой (рис. 9.52).

Рисунок 9.50

Схема организации теломерного конца хромосомы:

1 — повтор из гуаниновых нуклеотидов; *2* — теломерный концевой повтор (TR); *3* — последовательности, связанные с теломерой (TAS); *4* — собственно хромосома; *5* — центромера

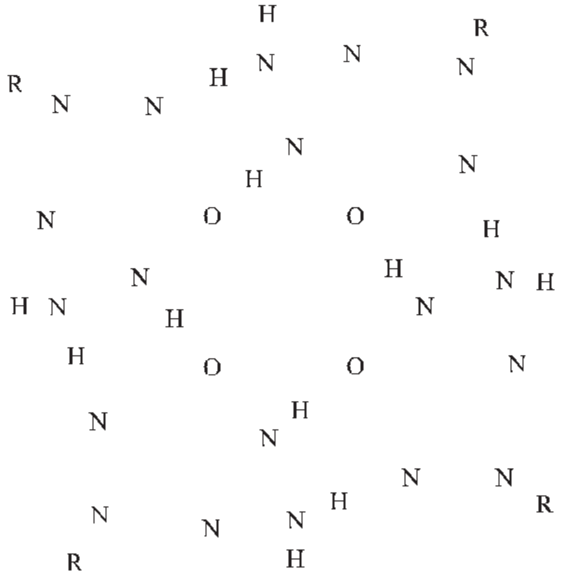
Рисунок 9.51



Структура теломерного концевого повтора в хромосомах инфузории окситрихи:

1 — теломерный концевой повтор,
2 — собственно хромосома

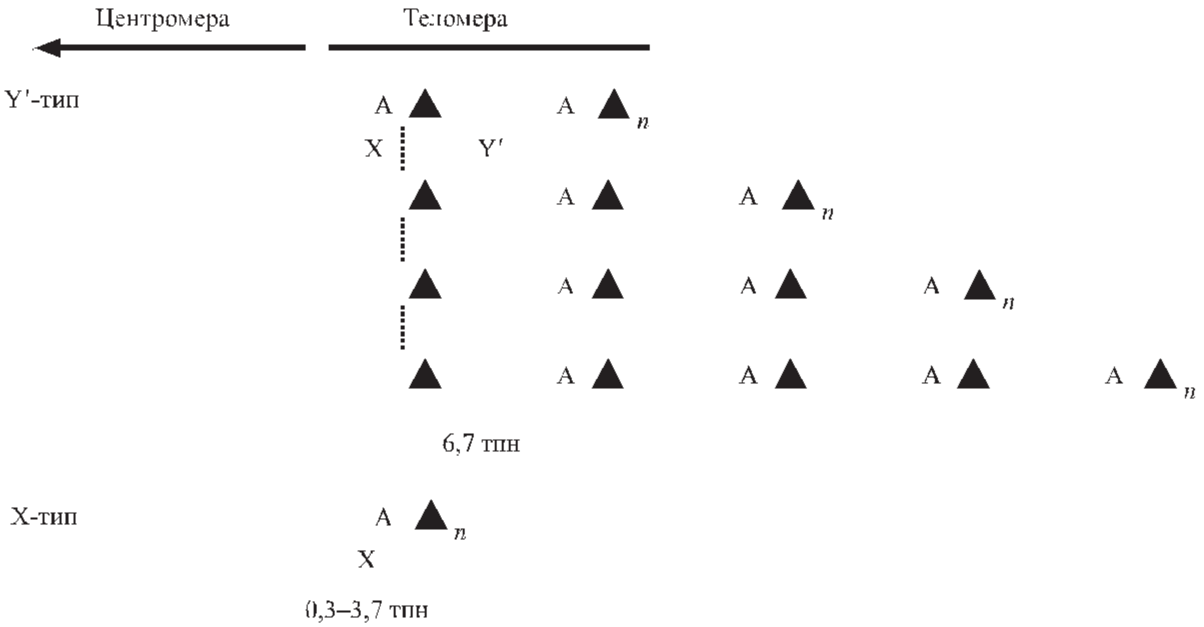
Рисунок 9.52



Гипотеза о плоскостном расположении молекул гуанина в теломерном повторе [Telomeres, 1995. P. 19].

Каждая молекула гуанина соединена с двумя соседними

Рисунок 9.53



Два типа хромосом дрожжей *S. cerevisiae*, различающихся строением прителомерного повтора [Chan, Tye, 1983. — Из: Жимулёв, 1993. С. 217].

Темными треугольниками обозначен концевой теломерный повтор; А — автономно реплицирующаяся последовательность (*ARS*). Субтеломерный повтор может состоять только из Х-элементов или различного числа Y'-элементов и Х-элементов

Рисунок 9.54

Схема строения двух теломерных ретротранспозонов *HeT-A* и *TART*, найденных у дрозофилы [Telomeres, 1995. P. 340].

Рисунок 9.55

Схема репликации концевого участка отстающей цепи ДНК при наличии теломерного повтора на 3'-конце ДНК.
Объяснения в тексте

Особенность формирования этой структуры заключается в том, что соединение нуклеотидов происходит не по принципу комплементарности оснований, а между молекулами одного и того же основания — гуанина.

Как уже отмечалось, рядом с теломерным повтором располагаются участки ДНК большой протяженности, называемые субтеломерными повторами — TAS.

У дрожжей описано два субтеломерных повтора, X и Y'. X имеет размеры 0,3-3,75 тпн и менее консервативен, чем Y' (5,2–6,7 тпн). Они чередуются, или повтор может состоять только из X-элементов (рис. 9.53).

Последние имеют открытые рамки считывания. На основе слабой гомологии в первичных последовательностях с мобильными элементами предположили, что Y'-элементы возникли из одиночной инсерции в предковый геном дрожжей [Telomeres, 1995].

Субтеломерные повторы обнаружены у многих видов. Общая длина тракта может быть очень большой — у хирономуса до 300 тпн в каждой теломере.

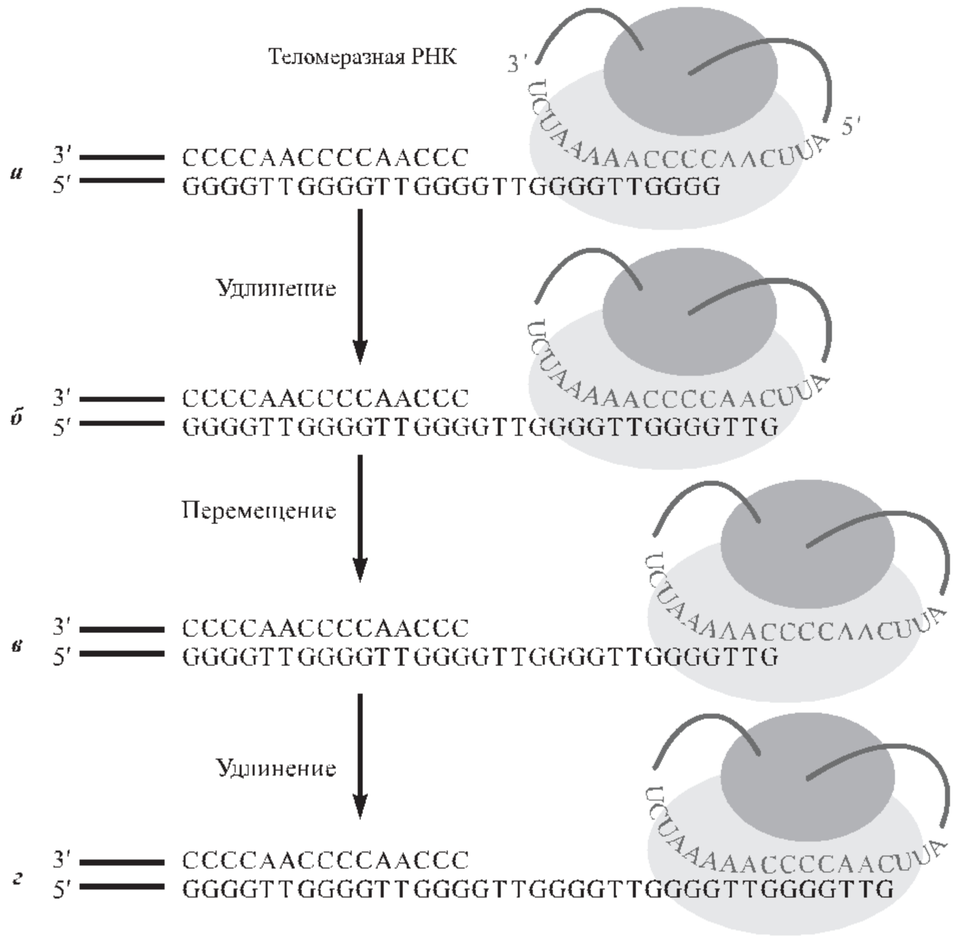
С теломерными последовательностями связаны два белка. У человека это TRF1 и TRF2 (TTAGGG repeat factors 1 and 2).Они гомологичны белку дрожжей Tbf1p (TTAGGG-binding protein). С-терминальная последовательность каждого из этих полипептидов названа телобоксом. Эти белки полностью перекрывают как выступающий конец ДНК, так и двухцепочечную часть субтеломерного района.

По иронии судьбы термин «теломера» возник в результате исследований на дрозофиле. В то же время до сих пор нет никаких доказательств того, что в геноме дрозофилы есть короткие теломерные G-богатые последовательности, характерные для большинства других видов.

У дрозофилы на концах хромосом расположены теломеро-специфичные ретротранспозоны, *HeT-A* и *TART* (рис. 9.54). В общих чертах они имеют похожее строение. У обоих на 5'-конце присутствуют небольшие повторенные последовательности, а на 3'-конце — более протяженный повтор, завершающийся длинным фрагментом, содержащим только нуклеотиды с аденином $(A)_n$. Различаются они тем, что *HeT-A* имеет две частично наложенные одна на другую рамки считывания (ORF), кодирующие белки, в то время как *TART* — две, ORF1 и ORF2, расположенные тандемно. Оба ретротранспозона присутствуют во многих копиях, главным образом в прицентромерных районах. Они могут перемещаться по геному и в случае утраты теломерного района встраиваются на самый конец хромосомы, восстанавливая теломерную структуру.

Несмотря на то что молекулярная структура теломеры была к началу 90-х гг. в основном охарактеризована, проблема неполной репликации на конце линейной молекулы ДНК (см. рис. 9.47) осталась. В 1985 г. Грейдер и Блакберн выяснили, что природа выработала механизм удлинения (элонгации) самого конца хромосомы, т. е. теломерного концевого повтора. Это связано с активностью особого фермента — теломеразы. Это рибонуклеопротеид, он содержит короткую молекулу РНК (примерно 150 нуклеотидов, среди которых 2 копии теломерного повтора 5'-CAACCC-3').

Рисунок 9.56



Удлинение теломерного повтора с помощью фермента теломеразы [Telomeres, 1995]. Объяснения в тексте

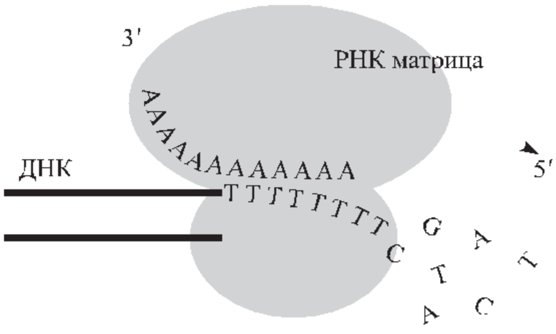
Перед началом цикла репликации ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3'-конец ДНК (рис. 9.55). После этого репликация идет в обычном порядке. На отстающей цепи синтезируются РНК-праймеры, при этом наиболее важно то, что концевой праймер синтезируется на теломерном повторе. После завершения репликации остается незаполненным только участок РНК-праймера, синтезированного на теломерной последовательности. В результате кодирующие части дочерних цепей ДНК получаются той же длины, что и родительских (см. рис. 9.55).

Часть нуклеотидов на 3'-конце отстающей цепи все же не будет реплицироваться. Но эта неполная репликация произойдет в зоне теломерного повтора, что не причинит никакого вреда генам, расположенным рядом.

Однако через несколько циклов репликации теломерный повтор «растает» и недорепликация начнет затрагивать гены. Поэтому второй функцией теломеразы является постоянное наращивание G-нити. Теломераза обладает своей молекулой РНК, имеющей матричный участок (рис. 9.56), с помощью которого фермент распознает теломерный повтор. Последовательность 5'-CAACCCCAA-3' в составе молекулы теломеразы спаривается с последовательностью теломерного повтора 5'-TTGGGG-3' (рис. 9.56, *а*). Нуклеотиды AAC в РНК теломеразы остаются неспаренными, и на них достраиваются TTG (*б*). Фермент перемещается на самый конец теломерной последовательности, т. е. на всю длину TTGGGGTTG, и нуклеотиды AAC из молекулы теломеразной РНК спариваются с TTG теломерной ДНК (*в*), после чего достраивается вся последовательность повтора. Принцип удлинения концевого участка молекулы ДНК у дрозофилы тот же, что и у других видов (рис. 9.57).

Таким образом, очевидно, что конец хромосомы как бы «запечатан» особой ДНК-белковой структурой, которая позволяет нормально реплицироваться ДНК всей хромосомы. В по-

Рисунок 9.57



Механизм репликации теломерного района в мобильном элементе *HeT-A* у дрозофил [Pardue et al., 1996]

следнее время накапливаются данные о том, что нарушения в механизме удлинения теломерного повтора непосредственно связаны с формированием злокачественных новообразований, а также играют важную роль в процессе старения.

Теломеры в клетках зародышевого пути благодаря постоянно высокой активности теломеразы сохраняют нормальную длину. Однако в соматических клетках, культивируемых *in vitro*, теломераза неактивна и теломеры постоянно укорачиваются (рис. 9.58). Этим можно объяснить существование барьера Хейфлика. В раковых клетках, которые также являются соматическими, клеточные деления не прекращаются и теломеры не укорачиваются. Оказалось, что почти во всех образцах опухолевых клеток, взятых как из культуры, так и из целого организма, активность теломеразы сохраняется на высоком уровне (см. рис. 9.58). Это обстоятельство позволило ученым пофантазировать: если бы удалось найти химический реагент, избирательно инактивирующий теломеразу, то при его применении опухолевые клетки быстро достигали бы барьера Хейфлика и погибали, в то время как в соматических клетках действие этого агента не ощущалось бы, так как в них теломеразы нет.

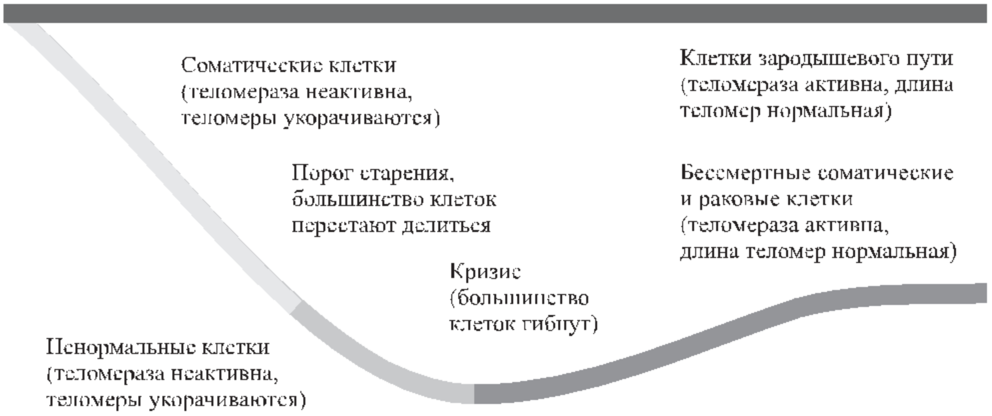
И наконец, в середине января 1998 г. в американском журнале «Science» [Bodnar et al., 1998] появилась статья, взбудоражившая общественное мнение. Ее авторы сообщили об успешном эксперименте, в ходе которого удалось преодолеть барьер Хейфлика в культуре клеток человека. Несколько групп американских исследователей с помощью генно-инженерных методов смогли ввести в геном соматических клеток человека ген каталитической субъединицы теломеразы, снабженный регуляторными элементами ДНК, которые и заставили этот ген активно работать в тех клетках, в которых он обычно неактивен. Авторы обнаружили, что длина теломер в этих клетках начала увеличиваться, так же как и продолжительность жизни клеточных культур: сверх обычных 50 делений клетки прошли как минимум 20 дополнительных.

Результаты, приведенные выше, показывают, какую огромную роль в жизни организма играют маленькие участки ДНК, расположенные на концах хромосом.

Теломерные районы хромосом имеют следующие свойства, сближающие их с гетерохроматином:

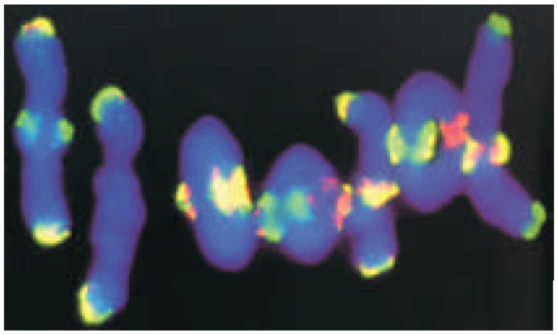
1. В состав теломер входят повторенные последовательности, при этом число копий в кластере варьирует. В хромосомах ржи очень крупные блоки гетерохроматина сконцентрированы в теломерных участках хромосом (рис. 9.59).

Рисунок 9.58



Изменение длины теломер у человека [Greider, Blackburn, 1996].
По горизонтали — число клеточных делений, по вертикали — длина теломеры

Рисунок 9.59



Хромосомы ржи (окрашены синим) после гибридизации *in situ* фракций теломерного гетерохроматина (окрашены красным и зеленым).

Желтый цвет появляется в результате наложения красного и зеленого в местах, где локализуются обе фракции теломерных повторов. Сигналы выявляются в теломерных и центромерных областях хромосом.

Фотография любезно предоставлена А. В. Вершининым

Рисунок 9.60

Выявление С-гетерохроматина на теломерных концах митотических хромосом ржи.

Фотография любезно предоставлена А. И. Щаповой

2. Теломеры обычно расположены на ядерной оболочке [Telomeres, 1995].

3. Теломерные концы хромосом чаще всего создают ассоциации, т. е. теломеры разных хромосом конъюгируют [Жимулёв, 1993; Telomeres, 1995].

4. Теломеры вступают в ассоциации с многими другими районами генома, в первую очередь с прицентромерным и интеркалярным гетерохроматином.

5. В некоторых случаях (очень редко) в теломерных районах выявляется слабая С-окраска (рис. 9.60).

6. В политенных хромосомах теломерные районы политенизируются не полностью, т. е. теломерная ДНК недореплицирована.

7. Белок HP1 выявляется в теломерах.

8. Гены могут инактивироваться, если они перенесены в окрестности прицентромерного гетерохроматина (это свойство имеет название эффекта положения генов — см. гл. 10). Есть данные о действии модификаторов эффекта положения на проявления свойств теломер.

Литература к разделу 9.6

Богданов А. А. Теломеры и теломераза // Соросовский образовательный журн. 1998. № 12. С. 12–18.

Дымшиц Г. М. Проблема репликации концов линейных молекул ДНК и теломераза // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 5. С. 8–13.

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 79–100.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 207–243.

Оловников А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.

Теломера, теломераза, рак и старение // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1379–1566.

Ancelin K., Brun C., Gilson E. Role of the telomeric DNA binding protein TRF2 in the stability of human chromosome ends // BioEssays. 1998. Vol. 20. P. 879–883.

Bodnar A. G., Ouelette M., Frolkis M. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // Science. 1998. Vol. 279. P. 349–352.

Greider C. W., Blackburn E. H. Telomeres, telomerase and cancer // Sci. Amer. 1996. Vol. 274. P. 80–85.

Greider C. W., Blackburn E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts // Cell. 1985. Vol. 43. P. 405–413.

Olovnikov A. M. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. Vol. 41. P. 181–190.

Pardue M. L., Danilevskaya O. N., Lowenhaupt K., Slot F., Traverse K. L. *Drosophila* telomeres: new views of chromosome evolution // Trends in Genetics. 1996. Vol. 12. P. 48–52.

Telomeres / E. H. Blackburn, C. W. Greider (eds). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. 396 p.

Zakian V. A. Life and cancer without telomerase // Cell. 1997. Vol. 91. P. 1–3.

Zhimulev I. F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation // Advances in Genetics. 1998. Vol. 37. P. 238–282.

9.7. ДИМИНУЦИЯ ХРОМАТИНА И ХРОМОСОМ

Явления дифференцировки клеток зародышевого пути и сомы, связанные с потерей части генетического материала в раннем эмбриональном развитии (диминуция хроматина, элиминация хромосом), довольно широко распространены в природе. Диминуция хроматина в той или иной степени известна у некоторых видов аскарид, циклопов, инфузорий, клещей, жуков, бабочек, мух и рыб.

9.7.1. Диминуция хроматина у аскарид

У аскариды *Parascaris univalens* зигота содержит две хромосомы, в каждой из которых можно выделить тонкий прицентромерный и утолщенные концевые районы. У другого вида, *P. equorum*, $2n = 4$. Хромосомы содержат небольшие участки слабоокрашивающегося материала, которые вкраплены в огромные массы С-гетерохроматина (рис. 9.61).

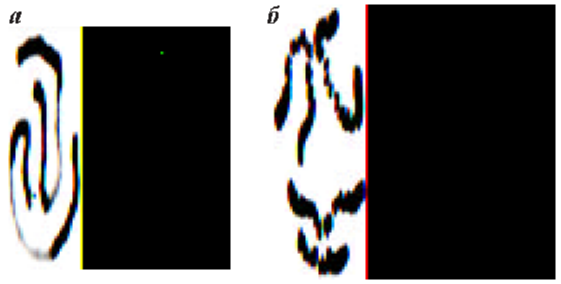
В 1887 г. Т. Бовери (T. Boveri) (рис. 9.62) обнаружил, что уже во время второго деления дробления в одной из клеток *P. univalens* утолщенные концы хромосом отделяются от средней части и, не имея центромер, остаются в районе экватора, где дегенерируют (рис. 9.63). В результате утрачивается существенная часть хромосом, происходит, по определению Бовери, диминуция хроматина. Клетка, прошедшая диминуцию, дает начало клону клеток (рис. 9.64), имеющих значительно укороченные хромосомы.

Что касается второй дочерней клетки, в ней диминуция не происходит и она дает начало двум новым клеткам: одна опять будет испытывать диминуцию, другая — нет. В результате этого у эмбриона, состоящего из 32 клеток, только две имеют полный набор последовательностей ДНК. Из них затем формируются клетки зародышевого пути, а из оставшихся 30 развиваются соматические клетки. Похожая картина диминуции описана и для другого вида — *A. lumbricoides*.

У *Parascaris equorum* при диминуции выпадают многочисленные внутренние утолщенные участки хромосом. Оставшиеся сегменты объединяются в одну общую хромосому. Показано, что у аскарид центромера голоцентрическая и нити веретена прикрепляются к многочисленным районам по всей длине хромосом. В клетках до диминуции микротрубочки митотического веретена прикрепляются только к районам хромосом, не удаляемым при диминуции.

У *P. univalens* отделяемые при диминуции концевые районы хромосом (до 80 % всего материала хромосом) имеют ярко выраженные характеристики гетерохроматина, такие как H- и C-окрашиваемость, гибридизуемость *in situ* с сателлитной ДНК. Центральная часть хромосом у *P. univalens*, не удаляемая при диминуции, не окрашивается на H- и C-гетерохроматин и не гибридизуется с сателлитной ДНК. В хромосомах *P. equorum* все утолщения хромосом обнаруживают C- и H-окрашивание и удаляются при диминуции.

Рисунок 9.61



С-окрашивание митотических хромосом *Parascaris univalens*, $2n = 2$ (*а*) и *P. equorum*, $2n = 4$ (*б*) до диминуции [Goday et al., 1985. — Из: Жимулёв, 1993. С. 68].

Рисунок 9.62

Теодор Бовери (1862–1915)

ДНК, подвергающаяся диминуции, обогащена повторами. Так, у *P. equorum* клетки зародышевого пути содержат два легких сателлита, которые вместе составляют около 85 % ДНК зиготы. Именно эти сателлиты и элиминируются в соматических клетках.

У *Ascaris lumbricoides* удаляется высокоповторенная ДНК с повторяющимися единицами длиной 125 и 131 пн.

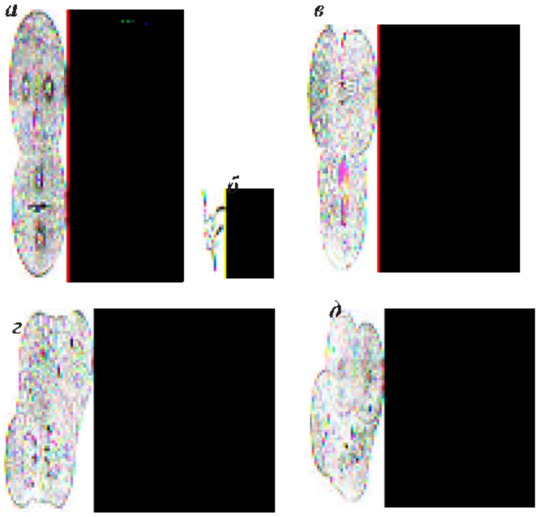
В целом 99 % сателлитной ДНК, присутствующей в клетках зародышевого пути, удаляется в ходе диминуции. Блоки умеренных повторов рДНК не удаляются. Элиминируются мобильные элементы, часть уникальных последовательностей. В результате образуются соматические ядра, в которых только ~10 % генома повторены и только 0,01–0,05 % — с высокой частотой.

После удаления концевых гетерохроматиновых фрагментов хромосом на них формируются новые теломеры (повтор TTAGGC).

9.7.2. Диминуция хроматина у циклопов

Кроме аскарид, диминуция хроматина обнаружена у нескольких видов циклопов. Она происходит во время 4–7 делений дробления

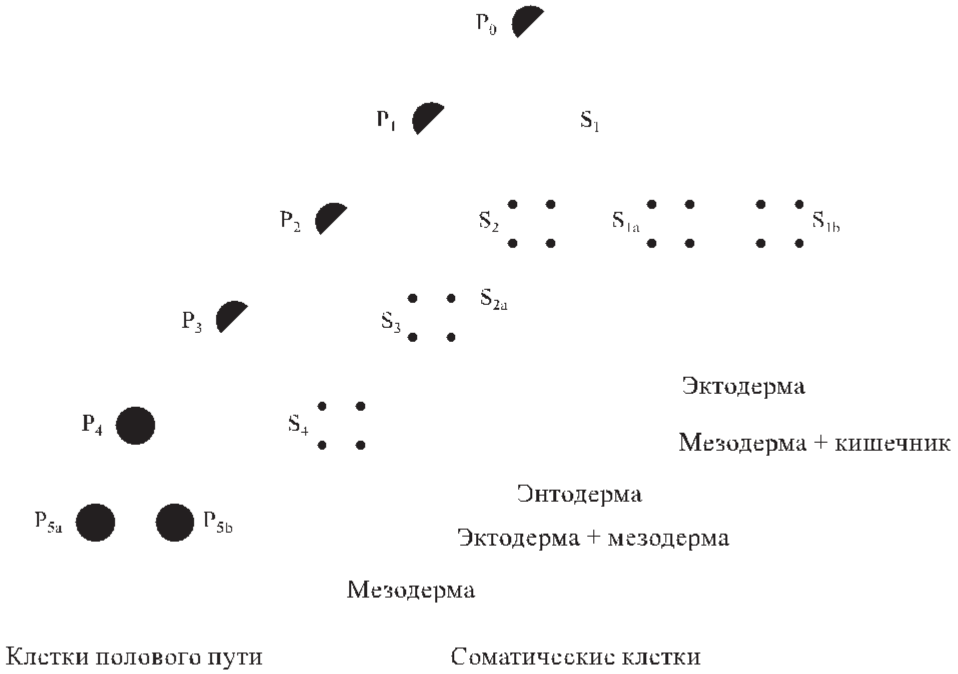
Рисунок 9.63



Диминуция хроматина у аскариды *Ascaris megalocephala* на ранних этапах дробления [T. Boveri. — Из: Вильсон, 1936. С. 290]:

а — второе деление дробления; *б* — вид с полюса на хромосомы верхней клетки (идет диминуция); *в* — более поздняя стадия (элиминация хроматина у экватора верхнего веретена); *г* — четырехклеточная стадия (в двух верхних клетках видны капли элиминируемого материала); *д* — третье деление дробления

Рисунок 9.64

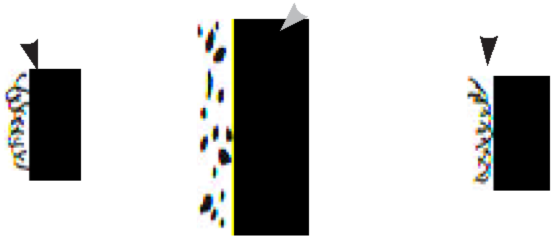


Схема, иллюстрирующая процесс диминуции хроматина во время делений дробления у аскарид [T. Boveri, с изменениями, Tobler et al., 1992. — Из: Zhimulev, 1998. P. 80].

Черными кружками обозначены клетки, не испытывающие диминуции. Стволовые клетки (P_0–P_3) дают начало одной клетке без диминуции и одной с диминуцией. Белые круги с точками (S) обозначают соматические клетки, в которых происходит диминуция

Рисунок 9.65

Cyclops kolensis Lill



Cyclops strenuus strenuus Fisher

Локализация элиминируемого хроматина в делящихся клетках у двух видов циклопов [Grishanin, Akif'ev, 1999].

Черными стрелками указаны хромосомы в анафазе, серыми — элиминируемый материал

Таблица 9.4. Длительность интервалов между делениями дробления зародышей *Cyclops kolensis* и *C. strenuus strenuus* [Гришанин, 1996. С. 9–10]

Интервал между делениями	Длительность интервала, мин	
	Cyclops kolensis	*C. strenuus strenuus*
1–2	70–90	40–50
2–3	70–90	40–50
3–4	480–540*	40–50
4–5	50–60	170–190*
5–6	50–60	80–90
6–7	50–60	35–40
7–8	50–60	35–40

* Начиная с этого интервала и дальше имеются в виду соматические клетки.

(у разных видов). Хроматин элиминируется из различных участков хромосом: терминальных гетеропикнотических фрагментов у *Cyclops divulsus*, *C. furcifer* или из интеркалярных — у *C. strenuus*. Элиминируемый хроматин остается в виде крупных блоков, капель или гранул в экваториальной части веретена деления.

В работах А. П. Акифьева и А. К. Гришанина наиболее полно описан процесс диминуции у *C. kolensis*. Диминуция у этого вида происходит во время 4-го деления дробления в 6 клетках зародыша из 8 и характеризуется тем, что в конце значительно удлиненной интерфазы в ядрах этих шести клеток появляются мелкие фельгенположительные гранулы или капли (около 600 в каждой клетке). Гранулы имеют диаметр 0,5–3,5 мкм. По мере наступления профазы и следующих стадий диминуционного деления хроматиновые гранулы сливаются, вокруг них формируется плотная однослойная лишенная пор мембрана толщиной около 50 нм. Лизис элиминируемой ДНК (эДНК) происходит, вероятно, внутри этих гранул. Такая неординарная структура мембраны, по-видимому, неслучайна. Элиминируемая ДНК представлена циклическими структурами, и если бы вокруг гранул формировалась обычная ядерная мембрана, компоненты которой присутствуют в делящихся клетках, то внутрь гранул с началом телофазы мог бы свободно поступать фактор(ы) декомпактизации. В таком случае гранулы эДНК превратились бы в обычные микроядра, которые в сумме содержали бы большую часть генетического материала клетки. Уникальная мембрана гранул эДНК обеспечивает надежную изоляцию материала, подлежащего лизису, и таким образом предотвращает возникновение хаоса в постдиминуционных клетках.

Расположение гранул, их ориентация по отношению к экватору клетки и веретену настолько характерны для данного вида, что служат надежным критерием в цитотаксономии рода *Cyclops* (рис. 9.65).

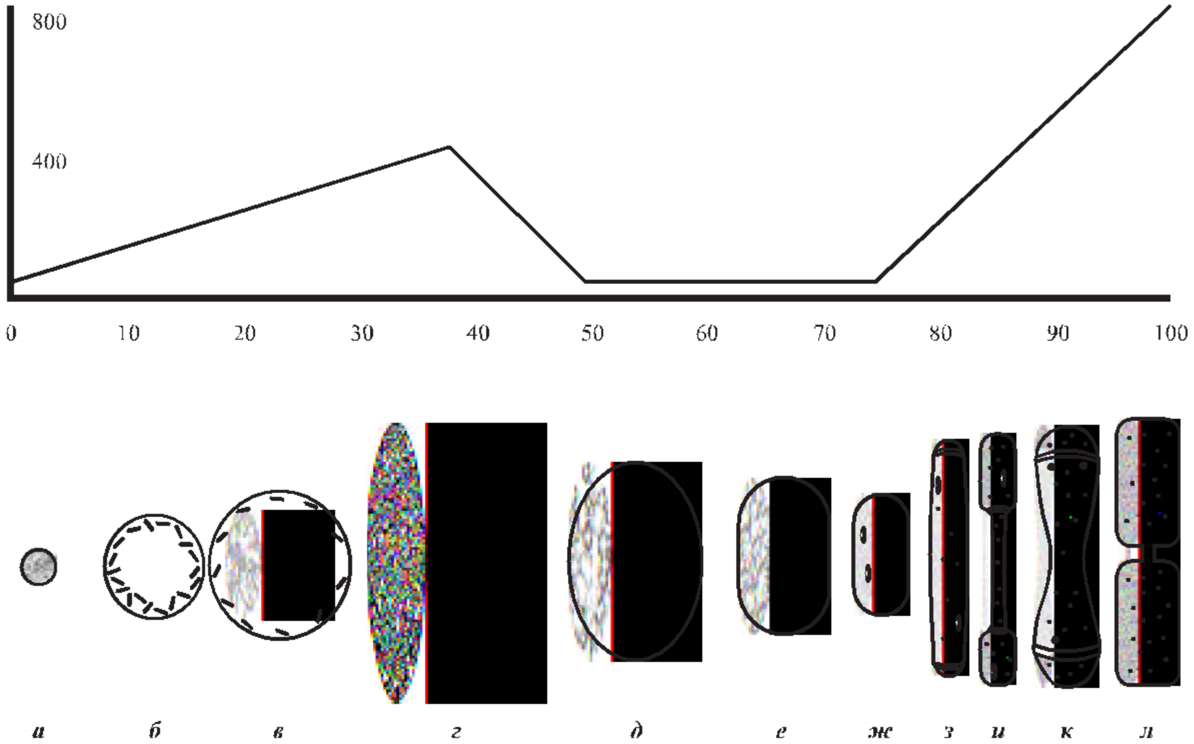
Число сайтов эксцизии, по которым идет вырезание элиминируемого хроматина, должно быть больше числа гранул, появляющихся в конце преддиминуционной интерфазы, т. е. минимум 500–600 у *C. kolensis,* минимум 160 у *C. strenuus*.

Продолжительность интерфазы значительно увеличена перед теми делениями дробления, в ходе которых формируются гранулы, т. е. происходит диминуция (табл. 9.4). После диминуционного деления интервалы между клеточными делениями вновь укорачиваются.

Содержание ДНК в соматическом геноме *C. kolensis* после диминуции оказалось равным 0,14 ± 0,02 пг, что составляет примерно 5–7 % от генома зародышевых клеток данного вида.

В ходе диминуции число хромосом не изменяется, однако размеры их, например у *C. kolensis*, резко уменьшаются: длина с 11–20 до 2,6 мкм, а диаметр — с 1 до 0,5 мкм [Гришанин, 1996]. В самых первых делениях дробления, и в особенности во время преддиминуци-

Рисунок 9.66



Развитие зачатка макронуклеуса у *Stylonychia lemnae* [Ammermann, 1987. — Из: Жимулёв, 1992. С. 80]. Верхняя кривая отражает изменения в количестве ДНК в зачатке макронуклеуса (в пикограммах). По оси абсцисс — время развития в часах. Объяснения в тексте

онного митоза, в хромосомах циклопов, у которых доля эДНК достаточно велика (50 % и более), без предфиксационной обработки обнаруживается поперечная исчерченность, весьма напоминающая G-полосы в хромосомах млекопитающих.

Первоначально С. Беерман в 1977 г. предположила, что эти полосы соответствуют сегментам эДНК и состоят из гетерохроматина. Она назвала их Н-сегментами и, по существу, представила всю диминуцию хроматина у *Cyclops* как процесс выброса гетерохроматина из генома зародышевых клеток. Такое предположение, постулирующее необычайно большую долю гетерохроматина в геноме *Cyclops* (у *C. kolensis* она, следовательно, должна быть около 90 %, а максимальная доля сателлитной ДНК в геномах ракообразных оценивается в 30 %), было опровергнуто в 1989 г. Д. Стандифордом, которому удалось с помощью С-окраски сравнить Н-сегменты и С-полосы, представляющие собой истинный конститутивный гетерохроматин. Совпадение локализации тех и других полос оказалось лишь частичным, и автор заключил, что некоторые Н-сегменты по структуре и составу оснований отличаются от С-полос. В то же время большинство С-полос в хромосомах зародышевых клеток не обнаруживаются в постдиминуционных хромосомах [Акифьев и др., 1998].

9.7.3. Элиминация хроматина у инфузорий

При созревании макронуклеуса (Ма) (рис. 9.66) диминуция хроматина происходит дважды. Первый раз удаляются целые хромосомы: через 10–15 ч после расхождения эксконъюгантов у *Stylonychia lemnae* примерно 140 хромосом становятся более компактными, перемещаются к внутренней мембране оболочки ядра и затем дегенерируют (рис. 9.66, *в*).

Оставшиеся 35–36 хромосом постепенно политенизируются (*г*), и еще через сутки начинается внутрихромосомная элиминация ДНК. Происходит она следующим образом: диски политенных хромосом поодиночке или небольшими группами окружаются мембраноподобным материалом, образуя пузырьки (*д*, *е*). Вся политенная хромосома распадается на множество независимых пузырьков, в которых лизируется удаляемая ДНК: элиминируется большая

часть высокоповторенных последовательностей, межгенные промежутки-спейсеры, мобильные элементы генома, а также внутренние (фактически внутригенные) элиминируемые последовательности (ВЭП). Все изученные до сих пор гены *Oxytricha nova* и *Euplotes crassus*, а их более 20, содержат ВЭП. В целом их число в микронуклеусе (Ми) составляет несколько десятков тысяч. ВЭП имеют на флангах короткие (2–19 пн) повторы, при участии которых, возможно, и происходит сплайсинг кодирующих последовательностей ДНК макронуклеуса.

Представляет интерес судьба транспозоноподобных элементов во время диминуции хроматина у простейших. Показано, что у *Euplotes crassus* два родственных семейства таких последовательностей — *TEC1* и *TEC2*, представленных примерно тридцатью тысячами копий, полностью элиминируются из генома в ходе созревания макронуклеуса. Подобное явление описано и у *O. fallax*.

Остаются только генетически значимые последовательности. К ним с обоих концов присоединяется теломерная ДНК, затем оболочки пузырьков распадаются и макронуклеус превращается в «мешок с генами». В это же время происходит процессинг ДНК.

В результате двух актов диминуции только 2 % последовательностей ДНК, имеющихся в микронуклеусе, остается в зрелом макронуклеусе.

9.7.4. Элиминация хромосом у двукрылых насекомых

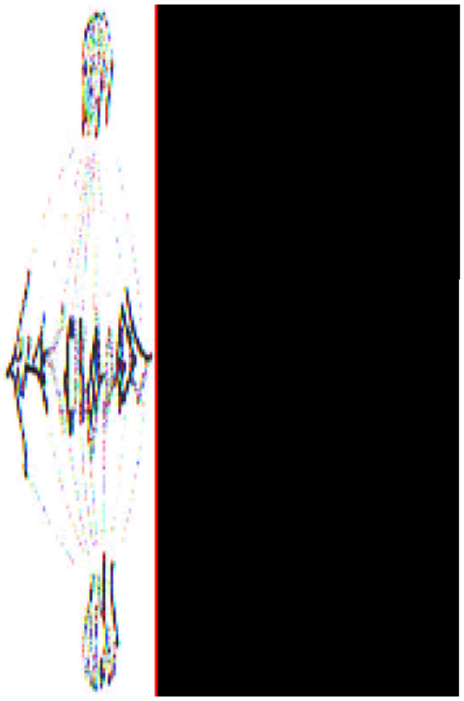
В 1908 г. В. Кале (W. Kahle) обнаружил диминуцию хроматина у галловой мушки *Miastor*, которая, как оказалось позднее, связана с потерей целых хромосом. Это явление встречается у представителей трех семейств отряда Diptera. У них были обнаружены два типа хромосом — Е-хромосомы (eliminated), которые ограничены только клетками полового пути и не встречаются в соматических клетках, и S-хромосомы (somatic), которые составляют основной набор хромосом в соматических клетках.

Число Е-хромосом может быть значительным: у представителей сем. Cecidomyidae в основном наборе 8 хромосом, а число хромосом, ограниченных клетками полового пути, варьирует от 8 до 60, у хирономид — от 1–4 до 26, у сциарид — 1–3 хромосомы.

Процесс элиминации происходит во время 3–7-го делений дробления. Е-хромосомы остаются на экваторе и дегенерируют (рис. 9.67).

Ряд фактов указывает на обогащенность элиминируемых хромосом гетерохроматином.

Рисунок 9.67



Элиминация хромосом в телофазе третьего деления дробления у *Miastor* sp. (Cecidomyidae) [Nicklas, 1959. — Из: Жимулёв, 1993. С. 76]. Шкала — 5 мкм

Если облучить только что вылупившихся личинок, может произойти транслокация материала Е-хромосом на S-хромосомы. Транслоцированные участки претерпевают политенизацию вместе с S-хромосомами. Этот материал обладает всеми свойствами гетерохроматина: имеет плотную компактную структуру, положительно окрашивается С- и Q-методами окраски, поздно реплицируется в S-периоде [Zhimulev, 1998].

9.7.5. Физиологическое значение диминуции хроматина и хромосом

Наиболее популярной является точка зрения, что гены, находящиеся в той части ДНК, которая сохраняется только в клетках полового пути, не участвуют непосредственно в генетическом контроле эмбриогенеза, личиночного развития и регуляции функций взрослого организма. Кажется естественным предположить, что эти гены участвуют в процессах оогенеза и сперматогенеза.

В. Хенниг (W. Hennig) полагает, что и гетерохроматин в целом должен быть прямо связан с особыми функциями клеток зародышевого

пути. По мнению А. Прокофьевой-Бельговской, гетерохроматиновые районы хромосом аскарид нужны только для осуществления мейотических процессов.

Однако есть и противоположные точки зрения. Так, А. П. Акифьев и А. К. Гришанин считают крайне маловероятным, что до 94 % генома у циклопов и 98 % у стилонихии кодирует только функции, специфичные для половых клеток, а остающаяся часть — все прочие.

Многочисленные гипотезы, предлагавшиеся ранее для объяснения биологической роли избыточной ДНК, оказались неверными в первую очередь из-за того, что они опирались на представления о ее соматических функциях, чаще всего — участии в генетической регуляции. Явление диминуции хроматина ясно показывает, что подлинное значение избыточной ДНК ограничено зародышевыми клетками.

По мнению А. П. Акифьева с сотрудниками [1998], единственное непротиворечивое на сегодняшний день объяснение возможной роли избыточной ДНК в клетках зародышевого пути состоит в том, что она является фактором генетической изоляции видов. Одной из наиболее изученных составляющих избыточной ДНК является гетерохроматин. Данные по диминуции хроматина, приведенные выше, так же как и другие новые факты, убедительно свидетельствуют о том, что функции большей части гетерохроматина ограничены клетками зародышевого пути. Чем более значительна разница в молекулярной структуре некодирующих участков, тем вероятнее нарушение конъюгации гомологов у гибридов со всеми вытекающими последствиями. Определение отдельных видов *Cyclops* затруднительно даже для опытных систематиков, что говорит о большом сходстве генов, т. е. фракции уникальной ДНК, у сравниваемых видов. Однако различия в организации большей или меньшей доли эДНК предотвращает гибридизацию этих близких видов (разумеется, наряду с другими изолирующими механизмами).

Эти представления далеки от теорий «мусорной» ДНК, «эгоистичной» ДНК и т. п. Данная концепция подчеркивает эволюционную роль избыточной ДНК [Акифьев и др., 1998].

Очевидно, что процесс диминуции хроматина находится под генетическим контролем. Подробный анализ его этапов, который сделали для инфузорий Дж. Шапиро, а для циклопов — С. Беерман и А. Акифьев с сотрудниками, убедительно показывает, что для осуществления диминуции требуется скоординированная последовательная работа батарей из многих генов, скорее всего, даже десятков генов.

Рисунок 9.68

Севиль Ибрагимовна Раджабли
(1932–1989)

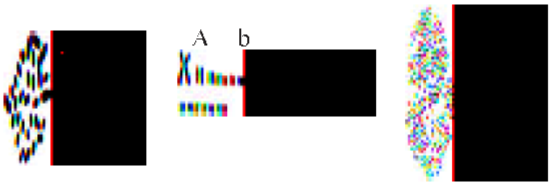
На уровне хромосомного фенотипа диминуция хроматина, безусловно, соответствует представлению о макромутациях. В то же время морфологические различия между видами циклопов порой настолько ничтожны, что даже опытные систематики предпочитают иметь дело с диминуцией хроматина, как критерием видовой самостоятельности, нежели с морфологическими характеристиками особей.

9.7.6. Реорганизация генома при полиплоидизации

Широко известно явление уменьшения размеров митотических хромосом в ходе полиплоидизации у растений. Оно было замечено в 1926 г. Л. Н. Делоне у представителей лилейных растений, затем А. Шармой у некоторых однодольных, А. Бебковым у растений рода *Crepis*. Уменьшение размеров хромосом, начиная с гексаплоидного уровня, было отмечено у некоторых видов мятлика, род *Poa* (Fernandes, 1969).

Наиболее заметные различия были обнаружены С. И. Раджабли (рис. 9.68) в кариотипах шелковицы (род *Morus*). Измерение хромосом у диплоидных и тетраплоидных форм позволяет считать, что на тетраплоидном уровне размеры хромосом шелковицы не уменьшаются, несмотря на увеличение их числа. Но при перехо-

Рисунок 9.69



а *б* *в*

Сопоставление размеров хромосом шелковицы *Morus alba* ($2n = 28$) и *M. nigra* ($2n = 308$) [Раджабли, 1966. С. 222]:

а — соматическая метафазная пластинка,
б — идиограмма *M. alba*;
в — соматическая метафазная пластинка *M. nigra*

де на более высокополиплоидные уровни, по-видимому, наблюдается изменение размеров хромосом. Так, у 308-хромосомной формы *Morus nigra* хромосомы резко уменьшены. Изменения затрагивают не только размер, но и форму хромосом, которые делаются более округлыми, а большинство — почти шаровидными. В связи с этим двуплечая структура А-хромосом становится почти незаметной (рис. 9.69). Размеры хромосом у полиплоидов шелковицы начинают уменьшаться с гексаплоидного уровня.

Результаты цитофотометрического определения количества ДНК как в геномах, так и в отдельных хромосомах полиплоидных форм шелковицы показали, что с увеличением числа хромосом от диплоидного до тетраплоидного содержание ДНК в геноме изменяется кратно числу хромосом. Однако в клетках высокоплоидной 308-хромосомной формы, несмотря на 11-кратное увеличение числа хромосом по сравнению с диплоидом, количество ДНК в ядре увеличивается только в четыре раза. Особый интерес представляет изменение количества ДНК на хромосому. У всех изученных видов шелковицы количество ДНК в хромосоме у ди-, три- и тетраплоидов находится на одном уровне. У 22-плоидной формы ($2n = 308$) значение этого показателя в три раза меньше, чем у низкоплоидных шелковиц. 12- и 13-плоидные гибриды занимают промежуточное положение между низкоплоидными формами и 22-плоидом: содержание ДНК на хромосому у них в 2 раза меньше, чем у низкоплоидных видов.

Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе эволюции у рода *Morus* произошли коренные изменения структуры генома, приведшие к резкому снижению содержания ДНК в хромосомах с увеличением степени плоидности [Ахундова, 1982].

Литература к разделу 9.7

Акифьев А. П. Диминуция хроматина — феномен, предназначенный для исследований ряда ключевых вопросов генетики // Вестн. ВОГиС. 1998. № 6. С. 11–13.

Акифьев А. П., Гришанин А. К. Некоторые биологические аспекты диминуции хроматина // Журн. общ. биол. 1993. Т. 54. С. 5–16.

Акифьев А. П., Гришанин А. К., Дегтярёв С. В. Диминуции хроматина, сопровождающиеся реорганизацией молекулярной структуры генома: эволюционные аспекты // Генетика. 1998. Т. 34. С. 709–718.

Ахундова Э. М. Полиплоидия и ДНК. Баку: Элм, 1982. 107 с.

Вильсон Э. Клетка. В 3 т. Т. 1. М.; Л.: Биомедгиз, 1936. С. 290.

Глазер В. М. Запрограммированные перестройки генетического материала в онтогенезе // Соросовский образовательный журн. 1998. № 8. С. 22–29

Гришанин А. К. Сравнительное изучение хромосом и интерфазных ядер в клетках зародыша *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea) до и после диминуции хроматина при помощи электронной микроскопии // Онтогенез. 1995. Т. 26. С. 188–195.

Гришанин А. К. Особенности диминуции хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Crustacea, Copepoda): Автореф. дис. … канд. биол. наук. М.: Инт-т биол. развития РАН, 1996.

Гришанин А. К., Акифьев А. П. Диминуция хроматина и организация хромосом у *Cyclops strenuus strenuus* // Генетика. 1993. Т. 29. С. 1099–1107.

Гришанин А. К., Бродский В. Я., Акифьев А. П. Соматические клетки *Cyclops strenuus* (Copepoda, Crustacea) теряют при диминуции хроматина более 90 % генома // Докл. АН. 1994. Т. 338. С. 708–710.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 67–77.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 64–66.

Раджабли С. И. Цитологическое исследование шелковицы. Сравнительное изучение селекционных сортов шелковицы // Экспериментальная полиплоидия в селекции растений. Новосибирск: Наука, 1966. С. 216–234.

Grishanin A. K., Akif'ev A. P. Interpopulation differentiation within *C. kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Copepoda): evidence from cytogenetic methods // Hydrobiologia. 1999. Vol. 417. P. 37–42.

Prescott D. M. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in Ciliates // Nature Reviews/Genetics. 2000. Vol. 1. P. 191–198.

Zhimulev I. F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation // Advances in Genetics. 1998. Vol. 37. P. 78–89, 304–306.

9.8. СТРОЕНИЕ ЦЕНТРОМЕРЫ

Центромера — специфическая область эукариотической хромосомы, которая играет фундаментальную роль в движении хромосом к полюсам деления и точном распределении вновь синтезировавшихся хроматид по дочерним клеткам во время митоза и мейоза. Частота ошибок в этих процессах невелика, но все-таки заметна. У дрожжей, например, частота нерасхождения хромосом составляет 10^{-5} или ниже, у человека этот показатель выше, хотя большинство зигот с неразошедшимися хромосомами гибнет во время эмбрионального развития. Нерасхождение хромосом происходит в тех случаях, когда центромера нормально не функционирует.

На ранних этапах подготовки хромосом к митозу центромера становится отчетливо видимой морфологической структурой и выглядит как перетяжка хромосомы. Функция центромеры, по крайней мере частично, заключается в обеспечении прикрепления к хромосоме нитей веретена. Центромера имеет свой цикл поведения в митозе и мейозе. В митозе и во втором делении мейоза у сестринских хроматид центромеры сохраняют тесную связь друг с другом дольше других участков хромосомы и разделяются только в начале анафазы. В первом делении мейоза, напротив, центромеры гомологичных хромосом в каждом биваленте начинают отталкиваться первыми с началом анафазы I, при этом центромеры сестринских хроматид ведут себя как единое целое. Обычно центромерный участок представлен в компактной интенсивно окрашивающейся метафазной хромосоме неокрашивающимся участком — первичной перетяжкой между двумя плечами хромосом (рис. 9.70).

У некоторых видов растений и животных существуют полицентрические хромосомы и хромосомы с нелокализованными диффузными центромерами (рис. 9.71). Подобные хромосомы обнаружены у ожики *Luzula purpurea*, скорпиона, некоторых представителей полужесткокрылых насекомых, а также у аскарид *A. megalocephala* в клетках зародышевого пути. Нити веретена прикрепляются к этим хромосомам по всей их поверхности, и в анафазе дочерние хромосомы отходят к полюсам параллельно одна другой в виде прямых палочек. После действия рентгеновских лучей эти хромосомы распадаются на фрагменты (см. рис. 9.71, *в*), каждый из которых имеет центромерный район и функционирует как нормальная хромосома.

Участок центромеры содержит кинетохор — обособленную структуру, контактирующую с центромерным районом, к которому прикрепляются микротрубочки — нити митотического веретена. Сформированный кинетохор метафазных хромосом представляет собой трехслойную пластину, состоящую из внутреннего слоя толщиной 40–60 нм, светлоокрашенного среднего слоя приблизительно 25–30 нм толщиной и внешнего слоя 40–60 нм. Внутренние слои кинетохорной пластины располагаются рядом с хроматиновыми тяжами и взаимодействуют с центромерным хроматином.

Рисунок 9.70

Центромерные участки хромосом в сперматогониях у Acrididae [Соколов, 1946. — Из: Прокофьева-Бельговская, 1966. С. 291]

Рисунок 9.71

а *б* *в*

Полицентрические хромосомы у кокцид [Hughes-Schrader, 1948. — Из: Прокофьева-Бельговская, 1966. С. 293]:

а — прикрепление нитей веретена по всей поверхности хромосомы в метафазе; *б* — положение концов хромосом в анафазе; *в* — прикрепление нитей веретена к хромосоме и к отдельным фрагментам в анафазе I мейоза

Рисунок 9.72

```
                            *         20          *         40          *         60
         TCA  TG
Cen6     ATCACGTGCT-ATAAAAATAATTATAATTTAAATTTTTTAATATAAATATATAAATTAAA
Cen11    GTCACATGAT-AAAAACATATTTAAAATTTTAAAAAAATTAATTTTCAAAATAAATTTAT
Cen10    ATCACGTGTT-AAATAATTAATTTACTTTAAAATTTATTTTTTAATATAAAATATTTATT
Cen8     ATCACATGAC-TAATAATTCTTTTAATTTTAATTAATTTAATAAAATTAAAATAATATAT
Cen5     ATCACGTGCT-TTTTAAAAAATATAAATTTAATTTCATTT-TCTATTTCAATATTTATTA
Cen7     ATCACGTGTTATATTTACTATATAAAAATTCAAT-AAATAAAAAGTTAGAAGATAAAAAT
Cen12    ATCACGTGTAATAAATATTATTAAAAAGTTTATTAAAATAAAATAATAATTTAAATTACT
Cen1     GTCACATGACATAATAATAAATAATTTTAAAAATATAAAATATTTTTAATACTTTTT--A
Cen2     ATCATGTGACTTATTTATTTAATTATTATTAAGTAAAAAAGATTTTCTATTTAAATT--T
Cen3     GTCACATGATGATATTTG--ATTTTATTATATTTTTAAAAAAAGTAAAAAATAAAAAGTA
Cen16    ATCACATGATATATTTTT--TATTTTTAATTTTTTTTAATTATAAAAATAATTTTTTTCT
Cen4     GTCACATGCTTATAATCA--ACTTTTTTAAAAATTTAAAATACTTTTTTATTTTTTATTT
Cen9     TTCACGTGAAAAT-TTTTATATTTTTAATTAAATTTTTATAATATTATAAATTATTATAA
Cen14    GTCACGTGCAGCT-TTTTAAAAATATTTTAAAACATTTTAAAAAATATACATTTTTTTAT
Cen15    ATCACGTGAACTTATTTTGCATTTAAAAAAAAGTAAAAACTATTTGCTAAAATATATTTT
Cen13    ATCACATGACTACCTAACAAAATATTTATTTTTCTTTTTTAATATTTGAAAATACTAAAA
         ◄ CDEI ►◄                    CDEII             (>90 % AT-rich)    ►

                            *         80          *        100          *        120
                                                       G     G    CCGAA
Cen6     AATAGAAAGTAAAAAAAGAAATTAAAGAAAAA-ATAGTTTTTGTTTTCCGAAGATGTAAA
Cen11    TATATTTTTTTAATTACATAATCATAAAAATA-AATGTTCATGATTTCCGAACGTATAAA
Cen10    CTTTTTATTTAAAAATAAAAAACACAAAAAAACAATGTTTATGATTTCCGAACCTAAATA
Cen8     ATACTAAATTGTTTATTAAAAATGATTAAACATTGGGTTT-TGTGTTCCGAACTTAGAAA
Cen5     AATAAAAAATTTGAAAAATATATAAAAATTGTAGCAGTATTAGATTTCCGAAAGAAAAA
Cen7     TATATTATACATATTTTTATTTTTATTATAATTTTTGTTTTTGGGTTCCGAAAAGAAAAT
Cen12    ATTTTTAAATAAGTTTTATTTTTTAATAACACTATTGTATTTGTTATCCGAACAATAAAA
Cen1     AATATTTTACAGTTTATTTTTTAAATTTATTTATATGTTTTTGTTTTCCGAAGCAGTCAA
Cen2     ATTAATTAATTTTTTTTCTTAAATAATTATTT-TATGTTTTTGTTTTCCGAAAAAGAAAA
Cen3     GTTTATTTTTAAAAAATAAAATTTAAAA-TATTAGTGTATTTGATTTCCGAAAGTTAAAA
Cen16    TTAAATTAAACAAAAATAAAAAATTGTT-TTTTGTTGGTTAAGATTTCCGAAAATAGAAA
Cen4     TTAAACATAAATGAAATAATTTAT-------TTATTGTTTATGATTACCGAAACATAAAA
Cen9     TATTGATATTTAAAATTA-AAAACAAAT-TATTAATGGTTTTGTTTTCCGAAATGTTTTT
Cen14    TATTTTTTTATATATTAATGTTAAAATT-TATTTATGTATTTGTCTTCCGAAAAGTAAAA
Cen15    TTTAATTTTTAAAAATAATGTTTTAATT-ATTTAATGTATATGACTTCCGAAAAATATAT
Cen13    TATTTTTGTTGTTTTTTGAAA-AAAGGATTTTTAATGTGTATGCGTTCCGAACTTTAAAT
         ◄                CDEII              ►◄       CDEIII        ►
```

Последовательности нуклеотидов в центромерах 16 хромосом *S. cerevisiae*
[Данные проекта «Геном дрожжей», Internet, 1998]

Тонкие хроматиновые нити проходят сквозь средние слои и, оказывается, связаны с внутренним и внешним слоями. Микротрубочки, связанные с кинетохором, заканчиваются во внешнем слое и редко протягиваются до среднего и внутреннего слоев. Помимо микротрубочек, внешние слои содержат «пушистую поверхность», или корону, состоящую из фибрилл, которые формируют петли наподобие ламповых щеток. В конце митоза кинетохор, как специализированная структура, исчезает.

С молекулярно-биологической стороны организация кинетохора изучена очень слабо. Однако известно, что кинетохор содержит ДНК, ДНК-связывающие белки, возможно, РНК и тубулин. Показано, что обработка ДНК-азой хромосом млекопитающих специфично конденсирует пластинку кинетохора, тогда как обработка РНК-азой не влияет на нее.

В настоящее время изучение организации центромерного района хромосом эукариот ведется лишь на некоторых объектах.

В 1980-х гг. в центромерах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были обнаружены последовательности, делеции которых приводят к утрате центромерной функции, что позволяет

определить локализацию центромеры на молекулярной карте. Центромерные районы у дрожжей называют районами *CEN* (от centromere) с добавлением цифры, обозначающей номер хромосомы. Сравнительный анализ центромер разных хромосом выявил важные закономерности в их структуре: центромерная ДНК всех хромосом этого вида дрожжей перекрестно гибридизуется, что свидетельствует об их гомологии. Результаты полного секвенирования всего генома дрожжей показали наличие в центромерных районах всех 16 хромосом консервативных доменов CDEI (centromere DNA element I), CDEII и CDEIII (рис. 9.72). Хотя все центромеры имеют одну и ту же функцию и центромерные районы очень похожим образом устроены, все же последовательности нуклеотидов в них не полностью идентичны.

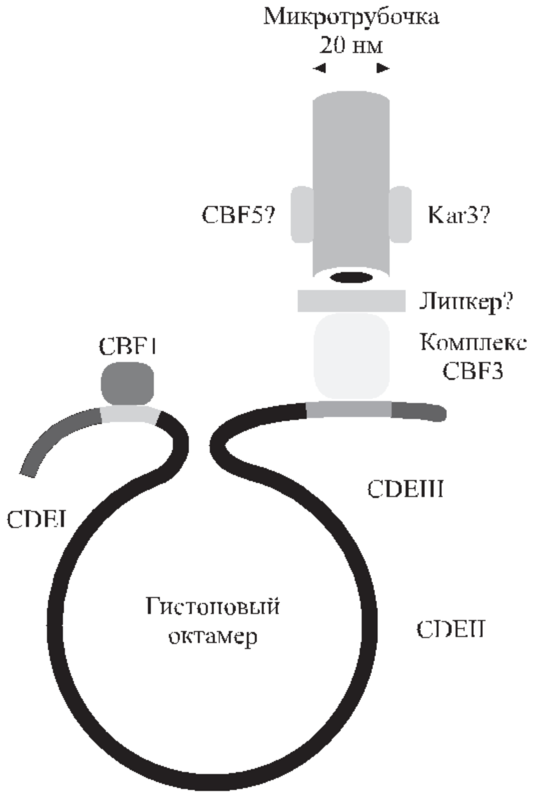
Элемент, называемый CDEI, в большинстве хромосом имеет 7 консервативных нуклеотидов TCACATG. Далее следует CDEII — фрагмент из 76–86 пн (число нуклеотидов в разных хромосомах разное). Собственно нуклеотидные последовательности в хромосомах различаются, но в каждой из них доля А–Т-пар превышает 90 % (93–94 %).

Элемент CDEIII состоит из 25 пн, из которых последовательность –G–––––G–––– CCGAA–––––––– присутствует во всех 16 хромосомах (см. рис. 9.72).

Делеционный анализ, выполненный на плазмидах, содержащих центромеры дрожжей, однозначно свидетельствует, что районы CDEI–III необходимы для митотической стабильности автономно реплицирующихся последовательностей (*ARS*) плазмиды. Для осуществления центромерной функции необходимы не целые элементы, а консенсусные группы. Так, делеция пяти левых нуклеотидов элемента I существенно не влияет на активность центромеры *CENII*, тогда как удаление АТ-богатой области (CDEII) полностью инактивирует центромеру. Высококонсервативный третий элемент (CDEIII) также принципиально необходим для функционирования центромеры. В нескольких работах было показано, что даже единичные делеции в этом районе полностью инактивируют центромеру.

Центромерные последовательности ДНК определены для ряда других организмов. Они оказались отличными от тех, что были найдены у *S. cerevisiae*, и различаются у разных видов. Так, у другого вида дрожжей, *S. pombe*, центромеры имеют длину от 40 до 80 тпн со сложным чередованием различных повторенных последовательностей. Таким образом, несмотря на то, что функция центромер одна и та же

Рисунок 9.73



Гипотетическая модель устройства кинетохора у дрожжей [Russell, 1998. P. 335]. Объяснения в тексте

у всех живых организмов, не существует единой последовательности ДНК, ответственной за выполнение этой функции.

Как центромерная ДНК организована в хроматин и как происходит прикрепление микротрубочек? К настоящему времени выявлены некоторые типы белков, которые взаимодействуют с центромерой и с микротрубочками (рис. 9.73).

В этой модели CBF1 (centromere binding factor 1) связывается с мотивом CDEI; комплекс белков CBF3 связывается с CDEIII. Более длинная последовательность CDEII предположительно обернута вокруг гистонового октамера. По-видимому, посредством линкерного белка фактор CBF3 связывается с концом микротрубочки.

Литература к разделу 9.8

Прокофьева-Бельговская А. А. Центромера // Руководство по цитологии. В 2 т. Т 2. М.; Л.: Наука, 1966. С. 289–294.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 655–678.

9.9. В-ХРОМОСОМЫ

Добавочными, или В-хромосомами, называют группу хромосом, различных по структурным и функциональным особенностям и находящихся в ядре сверх числа хромосом основного (А) набора. В-хромосомы встречаются как в клетках полового пути, так и в соматических.

В-хромосомы обнаружены у 510 видов двудольных растений (2,6 % от числа видов, у которых описаны кариотипы) и у 1007 видов однодольных (3,6 %). Из 263 видов животных, у которых найдены В-хромосомы, более 40 % составляют насекомые.

Число В-хромосом у разных особей сильно варьирует, в подавляющем большинстве случаев встречается 1–2 В-хромосомы, редко до 6, иногда их число доходит до 12.

Авторы большинства обзоров полагают, что В-хромосомы состоят в основном из гетерохроматина. У видов, имеющих политенные хромосомы, В-хромосомы часто тоже политенизируются. Выявлено большое разнообразие морфологии В-хромосом. Это могут быть бесструктурные глыбы рыхлого или компактного хроматина. В некоторых случаях это небольшие округлые или вытянутые сильно гетеропикнотичные тельца. Иногда В-хромосомы имеют характерный для политенных хромосом рисунок дисков, пуфы и очень часто ядрышки.

В В-хромосомах с дисковым рисунком часто наблюдают 1–2 крупных блока компактного материала, очень напоминающего гетерохроматин.

Об обогащенности В-хромосом гетерохроматином свидетельствуют следующие факты: в клеточном ядре они расположены на внутренней стороне ядерной оболочки, участвуют в эктопических контактах, часто они не политенизируются (свойство, характерное для гетерохроматина), окрашиваются на С-гетерохроматин, фрагменты В-хромосом обнаруживают позднюю репликацию.

Очень часто В-хромосомы обогащены сателлитными ДНК. Семейства этих повторов могут быть специфичными только для В-хромосом или же встречаются как в В-хромосомах, так и в других хромосомах.

По мнению многих ученых, В-хромосомы возникли из А-хромосом: 1) в результате гибридизации разных видов, 2) в результате нерасхождения некоторых А-хромосом и возникновения трисомии.

После того как прото-В-хромосома появилась, начинается инактивация расположенных там генов и потеря материала в результате делеций, фиксация в этих хромосомах сателлитных ДНК и мобильных элементов.

Литература к разделу 9.9

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 244–261.

Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. С. 239–245.

Hackstein J. H. P., Hochstenbach R., Hauschtek-Jungen E., Beukeboom L. W. Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? // BioEssays. 1996. Vol. 18. P. 317–323.

Дополнение 9.1

Н. К. Кольцов вспоминал: «Сорок с лишним лет назад (в 1893 г.) в Москве состоялся очень интересный съезд естествоиспытателей и врачей — первый крупный съезд, на котором мне пришлось присутствовать и даже выступать со своим первым научным докладом…

Одно из общих собраний съезда было особенно замечательным и врезалось, конечно, в память молодежи. Пришел и сел среди президиума Лев Николаевич Толстой, в своей обычной блузе и высоких сапогах. Он явился в чужой лагерь естествоиспытателей и врачей послушать речь своего друга, проф. В. Я. Цингера — математика, ботаника и философа-идеалиста.

Когда я увидел Л. Н., то вспомнил одну фразу из его статьи „О назначении науки и искусства“: „Ботаники нашли клеточку и в клеточках-то протоплазму, и в протоплазме еще что-то, и в той штучке еще что-то. Занятия эти, очевидно, долго не кончатся, потому что им, очевидно, и конца быть не может, и потому ученым некогда заняться тем, что нужно людям. И потому опять, со времен египетской древности и еврейской, когда уже была выведена и пшеница, и чечевица, до нашего времени не прибавилось для пищи народа ни одного растения, кроме картофеля, и то приобретенного не наукой“.

Противоречие между этими взглядами великого писателя и высказываниями собравшихся на съезд натуралистов было особенно подчеркнуто тем обстоятельством, что Л. Н. Толстой появился в зале в тот момент, когда с кафедры говорил профессор сравнительной анатомии М. А. Мензбир, рассказывавший про клеточку и про протоплазму, и про ядро, и про заключенные в ядре хромосомы, а внутри хромосом — другие „штучки“: иды и детерминанты (по А. Вейсману)». (Из статьи Н. К. Кольцова «Наследственные молекулы», 1935.)

Глава 10
ЭФФЕКТЫ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА

10.1. ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА В РЕЗУЛЬТАТЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЙ ЕГО В СИСТЕМЕ ГЕНОМА

Довольно скоро после того, как генетики пришли к определению понятия гена как единицы наследственной информации, расположенной и функционирующей в определенном участке хромосомы, были обнаружены факты, свидетельствующие о том, что проявление гена может меняться в результате перемещений его в системе генома. Изменения активности гена при изменении его положения в геноме называют эффектами положения.

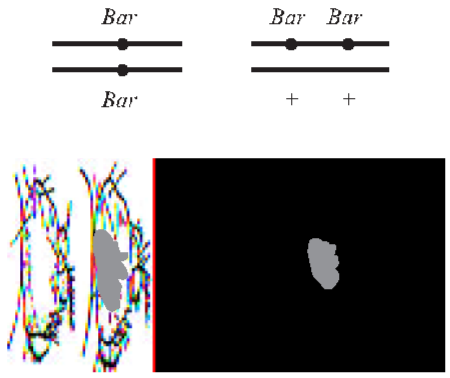
Впервые эффект положения был обнаружен в 1925 г. одним из основоположников генетики А. Стёртевантом, который показал, что когда в результате неравного кроссинговера оба мутантных аллеля гена *Bar* у дрозофилы оказались в одной хромосоме (рис. 10.1), это существенно повлияло на экспрессию мутантного фенотипа по сравнению с ситуацией, когда эти же аллели были в разных гомологичных хромосомах. Явление, обнаруженное Стёртевантом, имеет особенность, отличающую его от других эффектов положения: мутантный фенотип проявляется более или менее стабильно, поэтому в 1954 г. будущий нобелевский лауреат Э. Льюис назвал его стабильным эффектом положения. Этот тип изменений активности генов напоминает по характеристикам обычную мутацию и имеет довольно широкое распространение, особенно в экспериментальной практике. Так, в 80-х гг. были обнаружены многочисленные примеры существенных различий в активности гена *white*, заключенного в материал транспозона, в зависимости от места встройки последнего в ту или иную часть хромосомы. Все эти примеры позиционных эффектов свидетельствуют о существенной зависимости экспрессии гена от специфического окружения, по-видимому, от того, под какой энхансер происходит встраивание гена.

В 1934 г. Н. П. Дубинин и Б. Н. Сидоров обнаружили факт ослабления доминирования нормального аллеля гена *cubitus interruptus* (*ci*) при перенесении его из соседства с прицентромерным гетерохроматином в какой-то из районов эухроматина, т. е. ген, нормально работавший, будучи расположенным рядом с гетерохроматином, инактивируется, если покидает это место и оказывается в участке эухроматина. Впоследствии это явление было названо эффектом Дубинина.

Особый случай представляет эффект положения мозаичного типа (МЭП, широко известная английская аббревиатура — PEV). В 1930 г. Г. Мёллер обнаружил удивительное явление: потерю доминантности у аллеля, расположенного в хромосомной перестройке, полученной в результате облучения, т. е. у гетерозиготы $R(g^+)/g$ (где R — хромосомная перестройка, а g — ген) аллель g^+ не проявляется, и особь имеет мутантный g-фенотип.

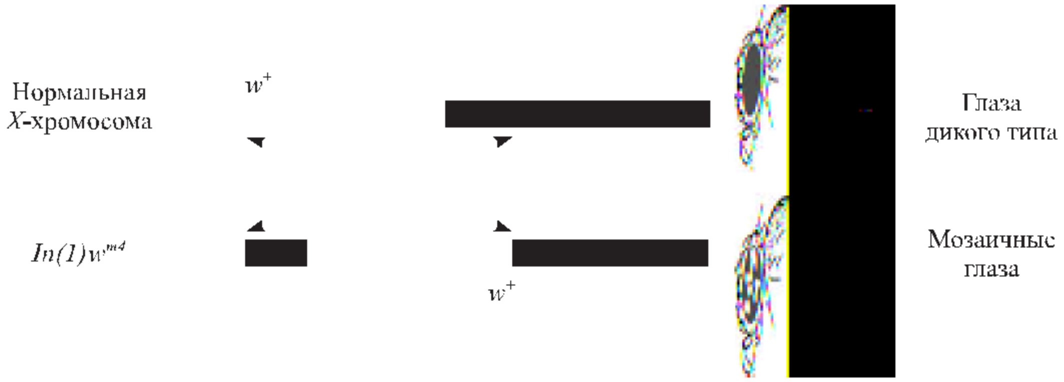
Уже сам Мёллер установил, что генетическая инактивация возникает, во-первых, в хромосоме с перестройкой, во-вторых, что ген должен быть перенесен в окрестности прицентромерного гетерохроматина (рис. 10.2). В-третьих, проявление гена становится мозаичным,

Рисунок 10.1



Изменение фенотипического проявления мутации *Bar* в зависимости от ее положения в геноме

Рисунок 10.2



Изменение активности гена *white*$^+$ *(w$^+$)* в результате перенесения его в окрестности прицентромерного гетерохроматина.

В нормальной линии ген *white*$^+$ кодирует продукт, контролирующий развитие красной окраски глаза. В линии с инверсией, например *In(1)w*^{m4}, переносящей этот ген в окрестности прицентромерного гетерохроматина, в части клеток он инактивирован, в результате чего клетки остаются неокрашенными и глаз становится мозаичным: группы нормально окрашенных клеток перемежаются группами неокрашенных клеток

т. е. при анализе большого числа относительно однородных клеток, например, слагающих омматидии глаза и имеющих одинаковый генотип — *R(g*$^+$*)/g,* в одной группе клеток проявляется мутантный аллель, в другой — нормальный.

Таким образом, эффект положения мозаичного типа можно коротко охарактеризовать следующим образом: ген инактивируется в результате переноса его из эухроматина в окрестности гетерохроматина, при этом в части клеток он сохраняет свою активность.

В последующие 70 лет исследователи открывали все новые и новые особенности инактивации генов при эффектах положения, основные сведения о которых будут приведены ниже.

10.2. ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ МОЗАИЧНОГО ТИПА

10.2.1. Структура гена при эффекте положения мозаичного типа

Как показали Н. П. Дубинин и Б. Н. Сидоров в 1935 г., при эффекте положения мозаичного типа ген не теряется, а изменяется лишь его состояние. С помощью кроссинговера они отделили инактивированный аллель от перестройки, а следовательно, и от соседства с гетерохроматином, и ген вновь стал стабильно формировать нормальный фенотип.

Несколько позже, в 1938 г., И. Б. Паншин получил обратные хромосомные перестройки, которые переносили инактивированный ген от гетерохроматина в исходное положение — в эухроматин. Активность гена при этом также восстанавливалась.

В результате получения огромного числа хромосомных перестроек и их проверки на способность индуцировать генетическую инактивацию было установлено, что эффект положения мозаичного типа проявляется только в перестройках между эу- и гетерохроматином. Любой ген у дрозофилы при наличии соответствующей перестройки, переносящей его в гетерохроматин, может инактивироваться, т. е. испытывать мозаичный эффект положения.

10.2.2. Распространение инактивации

У особей, в одной хромосоме которых находятся мутантные аллели нескольких близко расположенных генов (*a–e*), а в другой — их нормальные аллели, но перенесенные к гетерохроматину, можно зарегистрировать последовательную инактивацию нескольких генов

(рис. 10.3). В этой цепочке генов (a^{+}–e^{+}) чаще других инактивируется ген e^{+}, ближайший к гетерохроматину, с меньшей частотой инактивированы одновременно d^{+} и e^{+}, с еще меньшей — c^{+}, d^{+} и e^{+}, и т. д. Этот пример показывает, что инактивация, начавшись у точек соединения эу- и гетерохроматина, может распространяться по направлению от гетерохроматина к теломере. При удалении от гетерохроматина инактивация все более ослабляется. Инактивация может распространяться на очень большие расстояния — на десятки сантиморган.

10.2.3. Типы мозаичности

Вероятность инактивации гена в части клеток (мозаичность) при перемещении его к гетерохроматину следует изучать на одинаковых группах клеток, например, в сложном фасеточном глазу мухи или на ее кутикулярном покрове.

Описано два типа мозаичности в клетках глаз: секторальный и мелкопятнистый (соль-и-перец). Если в самом начале развития глаза ген w^{+} в системе $R(w^{+})/w$ инактивирован, то это состояние сохраняется в последующих клеточных делениях и возникает сектор из клеток с мутантным фенотипом (рис. 10.4). Если гены в клетках инактивировались в самом конце дифференцировки глаза, когда заканчиваются клеточные деления, то возникает мозаичность типа соль-и-перец. В этом случае клетки с мутантным и нормальным фенотипом расположены вперемежку.

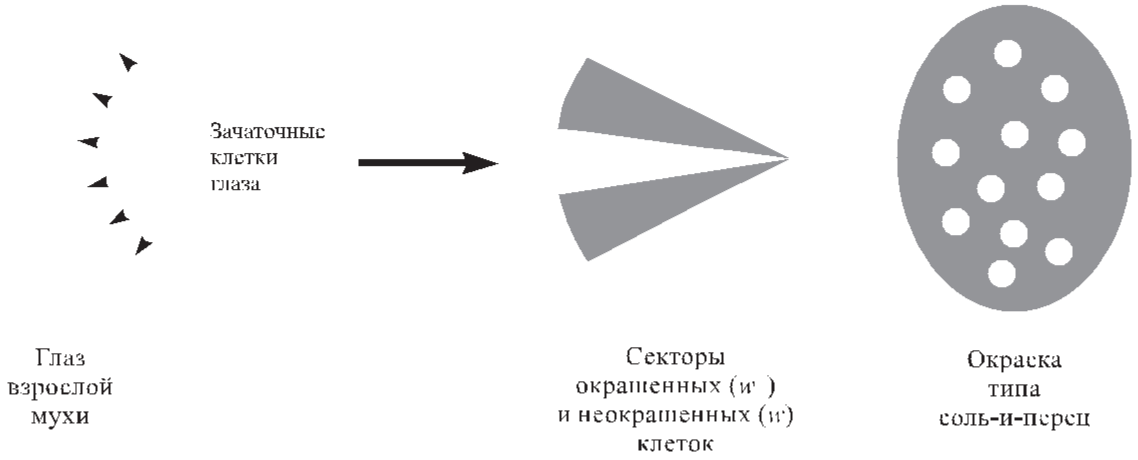
Рисунок 10.3

Схема распространения генетической инактивации при МЭП у дрозофилы:

а — гетерозиготный генотип, в котором одна хромосома (верхняя на рисунке) несет цепочку мутантных генов (от *a* до *e*), но расположенных в обычном для них месте на конце хромосомы в удалении от гетерохроматина, вторая хромосома (нижняя) несет нормальные аллели этих же генов, но они перенесены в окрестности гетерохроматина и, следовательно, могут инактивироваться; *б* — проявление генов.

Если ни один из генов не инактивирован, муха имеет фенотип a^{+} b^{+} c^{+} d^{+} e^{+}, если инактивирован ген *e* — ближайший к гетерохроматину, фенотип будет a^{+} b^{+} c^{+} d^{+} e, если инактивированы два ближайших гена *d* и *e* — a^{+} b^{+} c^{+} d e и т. д. Если в инактивацию будет вовлечена вся цепочка генов, то фенотип особи будет полностью мутантным: *a b c d e*

Рисунок 10.4



Типы мозаичности окраски глаз

10.2.4. Уровни инактивации гена

Долгое время обсуждали вопрос, на каком уровне происходит нарушение нормальной функции? Как уже говорилось, структура гена при МЭП не повреждается. Было установлено, что в клетках с мутантным фенотипом уменьшено число транскриптов с инактивируемого гена и количество его белкового продукта. Следовательно, при эффекте положения речь идет в первую очередь об инактивации транскрипции. Прямое доказательство этого получено в опытах с трансформацией ряда хорошо охарактеризованных генов. В частности, были созданы линии дрозофил, у которых ген теплового шока *hsp26* (см. разд. 13.10) встроен либо в эухроматин, либо в гетерохроматин. В первом случае ген *hsp26* нормально функционирует и отвечает на индукцию тепловым шоком. Напротив, при встройке в гетерохроматин он становится транскрипционно неактивным в ответ на тепловой шок.

При эффекте положения участок хромосомы, где расположен инактивируемый ген, испытывает компактизацию. Этот процесс изучают на клетках слюнных желез личинок дрозофилы, имеющих политенные хромосомы. Материал хромосомы становится плотным, сильно окрашивающимся, происходит слияние дисков в один плотный блок, начиная от точки контакта эухроматина с гетерохроматином (рис. 10.5).

Компактизация может распространяться на большие расстояния — до 170 дисков политенных хромосом. Поскольку диск в политенных хромосомах дрозофилы содержит в среднем около 30 тпн, протяженность инактивации в данном случае достигает 5000 тпн.

В 1991 г. Е. С. Беляевой было открыто уникальное явление — прерывистая инактивация участков хромосом, перенесенных в окрестности гетерохроматина. Суть ее сводится к тому, что гены инактивируются не последовательно от *e* к *a* (см. рис. 10.3), а прерывисто, например, $e^+\ d\ c^+\ b\ a^+$ или $e\ d\ c\ b^+\ a$ и т. д., а на хромосомном уровне компактные районы чередуются с обычными.

Если в случае непрерывной инактивации довольно легко представить себе, как некий «инактивирующий сигнал» из гетерохроматина распространяется вдоль по хромосоме, то в случае прерывистой компактизации должен существовать какой-то неизвестный механизм перескоков «инактивирующего сигнала».

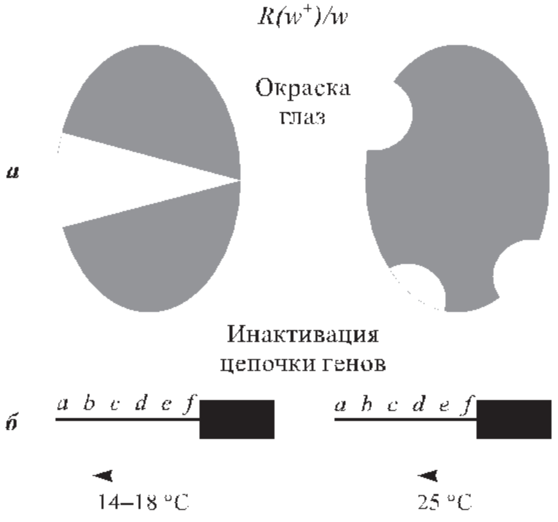
В результате компактизации участки хромосом, прежде эухроматиновые, приобретают ряд свойств, характерных для гетерохроматина: они становятся позднореплицирующимися, вступают в эктопические контакты. В компактных районах политенных хромосом ДНК не полностью реплицируется, так же как и в прицентромерном гетерохроматине. В блоках компактного хроматина выявляется белок HP-1, являющийся структурным компонентом гетерохроматина. В результате прежде эухроматиновый участок хромосомы становится гетерохроматиновым, т. е. гетерохроматинизируется.

Рисунок 10.5

Формирование блока компактного хроматина из участка *X*-хромосомы дрозофилы [Жимулёв, 1993. С. 347].

Крайний слева — фрагмент политенной *X*-хромосомы, перенесенный к прицентромерному гетерохроматину, от свободного (теломерного) конца 1А до участка соединения с гетерохроматином 2Е (черный блок). На следующих фотографиях можно увидеть процесс укорочения хромосомы, которая как бы втягивается в гетерохроматин. На крайней справа фотографии видно, что практически весь фрагмент хромосомы (1А–2Е) превратился в блок компактного темного материала

Рисунок 10.6



Увеличение размеров секторов глаза, состоящих из неокрашенных клеток у особей $R(w^+)/w$ (*а*) и протяженности генетической инактивации (*б*) при понижении температуры до 14–18 °C.

Черным прямоугольником обозначен гетерохроматин, *a–f* — инактивируемые гены. Стрелка указывает протяженность инактивации

Температурно-чувствительный период компактизации приходится на самое начало эмбриональной жизни, т. е. на то время, когда в хромосомах начинает выявляться гетерохроматин как цитологическая структура.

Процесс компактизации имеет три свойства, присущие собственно генетической инактивации при эффекте положения:

1) мозаичность, т. е. в одной клетке участок хромосомы находится в компактном состоянии, в соседней клетке район обнаруживает нормальную эухроматиновую структуру;

2) распространение вдоль по хромосоме от точки соединения эу- и гетерохроматина (см. рис. 10.5);

3) возможность прерывистого распространения.

10.2.5. Модификаторы эффекта положения

На степень проявления мозаичного фенотипа влияют многие факторы. Так, низкая температура (14–18 °С, нормальное развитие дрозофил проходит обычно при температуре 25 °С) резко усиливает генетическую инактивацию, что выражается в увеличении как размеров секторов неокрашеных фасеток, так и протяженности компактизации участков хромосом (рис. 10.6).

Изменение количества гетерохроматина в геноме оказывает существенное влияние на проявление эффекта положения. Легче всего варьировать количество гетерохроматина, изменяя число *Y*-хромосом в геноме. Во-первых, потому, что это самый большой гетерохроматиновый блок в геноме, а во-вторых, *Y*-хромосому легко вводить и удалять с помощью обычных скрещиваний (рис. 10.7).

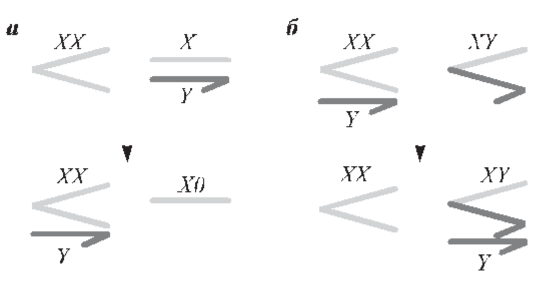
При удалении *Y*-хромосомы (самцы имеют генотип *X0*) генетическая инактивация резко усиливается. Добавление дополнительного гетерохроматина (самцы *XYY*) ослабляет инактивацию. Число *Y*-хромосом в геноме — сильнейший модификатор эффекта положения.

Кроме того, в настоящее время открыты несколько десятков генов, мутации которых могут приводить к усилению или ослаблению генетической инактивации, — модификаторы эффекта положения.

Используют следующую схему получения доминантных усилителей (энхансеров — enhancers, *En*) и ослабителей (супрессоров — suppressors, *Su*) (рис. 10.8). Для экспериментов берут самок из линии с перестройкой, в которой эффект положения проявляется не очень сильно, например, $In(1)w^{m4}$ со слабой мозаичностью гена *w*, и скрещивают с мутагенизированными самцами. Если индуцируется энхансерная мутация, то среди потомков появляются особи с резко увеличенным мутантным сектором глаза. При индукции супрессорной мутации число неокрашенных фасеток, наоборот, существенно уменьшается.

Модификаторы эффекта положения изменяют степень компактности инактивированного участка эухроматина. Низкая температура, удаление гетерохроматина из генома, действие генетических энхансеров резко увеличивают как частоту встречаемости клеток с компактизованными участками хромосом, так и протяженность компактизации. Высокая температура, добавление гетерохроматина и генетичес-

Рисунок 10.7



Схемы скрещиваний, позволяющие получать самцов, не имеющих *Y*-хромосомы (*X0*) (*а*) и имеющих две *Y*-хромосомы (*б*)

Рисунок 10.8

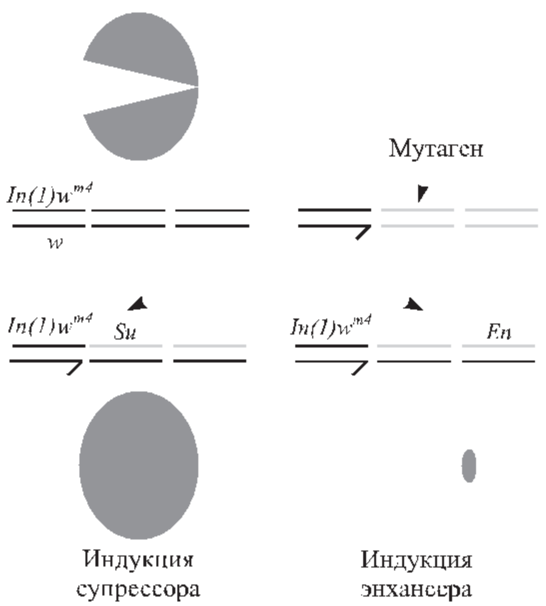


Схема скрещивания для получения энхансеров и супрессоров эффекта положения

Таблица 10.1. Характеристики генов-модификаторов эффекта положения мозаичного типа у дрозофилы [Wallrath, 1998]

Гены	Характеристики белков, кодируемых данным геном
	Доминантные супрессоры
Su(var)2–5	Белок HP1 имеет хромодомен, хромо-теневой домен и локализован в гетерохроматине
Su(var)3–7	Белок SU(VAR)3–7 имеет семь доменов типа «цинковые пальцы». Ассоциируется с гетерохроматином и белком HP1
Su(var)3–9	Белок имеет хромодомен и SET-домен
Su(var)3–6	Белок представляет собой каталитическую субъединицу протеинфосфатазы 1
k-43	Комплекс ORC (origin of replication complex). Ассоциируется с HP1
modulo	Белок имеет основные, амино- и карбоксильные домены, связывается с ДНК и РНК
Супрессор мутации z^5	Белок S-аденозилметионинсинтетаза, регулирует уровень спермина
lighten up	Дозовый регулятор экспрессии генов *white*, *copia* и *blood*
weakener of white	Дозово-чувствительный модификатор генов *white*, *brown*, *scarlet* и *copia*
modifier of white	Гомолог гена *CDC36* — регулятора транскрипции у дрожжей
Группа генов *Polycomb*	Белок содержит хромодомен
	Рецессивный супрессор
mutagen sensitive 209	PCNA polymerase δ processivity factor
	Доминантные энхансеры
E(var)3-93D	*mod* (*mdg4*); POZ-домен, взаимодействует с мутацией *su(Hw)*; ассоциируется с эухроматином
E(var)3-95E	Активатор транскрипции E2F, регулятор клеточного цикла
E(var)62/trithorax like	GAGA-фактор, имеет POZ-домен, ассоциируется с эухроматином
E(var)3-64BC	RPD3; гистондеацетилаза
E(var)3-64E	Убиктивин-специфическая протеаза
hel	Белок HEL; ATP-зависимая РНК-геликаза, имеет необычный DEAD-домен
	Рецессивный энхансер
zeste	ДНК-связывающийся белок, вовлечен в механизм трансвекции

кие супрессоры эффекта положения действуют в противоположном направлении.

После клонирования ДНК многих из известных на сегодня генов-модификаторов, получения антител на кодируемые ими белки и определения локализации этих антител в клетках выяснилось, что многие модификаторы кодируют белки, входящие в состав хромосом (табл. 10.1). Некоторые гены-модификаторы кодируют структурные белки хроматина, другие — белки, которые могут играть опосредованную роль в регулировании процесса формирования хроматина.

Одним из путей регулирования процессов формирования хроматина является модификация гистонов, в частности их ацетилирование. Таким образом, мутация, обусловливающая усиление ацетилирования гистонов, должна подавлять проявление эффекта положения.

Мутации в других модифицирующих белки ферментах и факторах репликации ДНК могут приводить либо к супрессии, либо к усилению МЭП (см. табл. 10.1). У дрожжей *S. cerevisiae* мультисубъединичный комплекс ориджина репликации (ORC) необходим как для репликации ДНК, так и для осуществления глубокой инактивации (сайленсинга) гена *mating type* (*MAT*). Поскольку мутации в разных субъединицах ORC дают разные эффекты на эти события, полагают, что сайленсинг и начало репликации не зависят друг от друга. У дрозофилы субъединица ORC2 локализуется в гетерохроматине и дефекты в ней супрессируют МЭП. Поскольку и у дрожжей, и у дрозофилы в процессы генной инактивации вовлечен один и тот же белковый комплекс, можно полагать, что механизм сайленсинга высококонсервативен.

И наконец, существенное влияние на эффект положения мозаичного типа оказывают мутации генов, кодирующих белки хроматина. Белок HP1, кодируемый геном *Su(var)2–5*, и белок SU(VAR)3–7 являются структурными блоками гетерохроматина. Утрата любого из этих белков приводит к супрессии МЭП.

Напротив, уменьшение количества белков, требуемых для формирования эухроматина, приводит к усилению МЭП (см. табл. 10.1). Примером может быть белок GAGA-фактор, кодируемый геном *trithorax like*, который играет большую роль в формировании декомпактизованного активного хроматина.

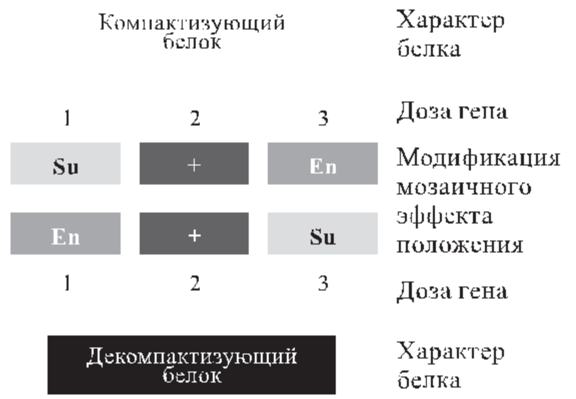
Рассмотрим более подробно характеристики некоторых белков.

Белок HP1 первоначально был обнаружен главным образом в районах прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом дрозофилы, в меньшей степени — в теломерах и некоторых эухроматиновых районах. Позже были найдены три белка у мыши, имеющие гомологию с HP1: M31 (иногда называемый MOD1), M32 (MOD2) и mHP1L. Антитела против M31 связываются с районами прицентромерного гетерохроматина в хромосомах как мыши, так и человека. Напротив, антитела против M32 локализуются в эухроматине. Также три белка, имеющие гомологию с HP1, обнаружены у человека: $HP1^{Hs\alpha}$, $HP1^{Hs\beta}$, $HP1^{Hs\gamma}$.

Белок HP1, состоящий из 206 аминокислотных остатков, на N-конце имеет специфическую структуру длиной 37 аминокислотных остатков, которая гомологична подобной области ряда других компактизующих белков, например из группы POLYCOMB, и названа хромодоменом. У многих других белков также существуют хромодомены. Все они составляют хромо-суперсемейство белков. Хромодомен имеет так называемый гидрофобный карман, который скорее всего участвует в белок-белковых взаимодействиях. Мутации, связанные с заменой аминокислот в гидрофобном кармане в белках HP1 и POLYCOMB, нарушают ассоциации белков в хромосомах.

В карбоксильном участке многих белков из хромо-суперсемейства найден второй домен — хромо-теневой. Этот домен нужен для того, чтобы HP1-белок связывался с гетерохроматином, в частности, он необходим для взаимодействия между HP1 и другими белками. В хромо-теневом домене также есть гидрофобный карман. Поэтому полагают, что белки, имеющие хромодомен и хромо-теневой домен, могут служить молекулами, связующими различные белки, которые входят в состав гетерохроматина.

Рисунок 10.9



Модификация проявления эффекта положения в зависимости от дозы генов, контролирующих компактизацию и декомпактизацию [Жимулёв, 1992]

Полагают, что белковая фракция гетерохроматина состоит из мультимерных белковых комплексов, в состав которых входят молекулы разнообразных белков. Кроме уже упоминавшегося HP1, одним из таких белков является SU(VAR)3–7.

Этот белок также обнаруживается в гетерохроматине. Его особенность состоит в том, что он имеет семь так называемых «цинковых пальцев», т. е. последовательностей аминокислот, образующих домен, в состав которого входит ион цинка. Конструкция имеет вид удлиненной петли — как бы «пальца» — и способна непосредственно связываться с определенной последовательностью ДНК (см. рис. 7.42).

Поскольку основной характеристикой гетерохроматина является его компактное состояние, можно предположить, что главная функция нормальных белков, таких как HP1 и SU(VAR)3–7, — компактизующая, а мутации приводят к ослаблению этой функции.

В результате изучения энхансеров и супрессоров выяснилось, что один и тот же ген может быть и энхансером, и супрессором. Все зависит от дозы гена. Легче всего это можно объяснить, если допустить существование белков, компактизующих и декомпактизующих материал хромосомы (рис. 10.9). В двух дозах они осуществляют необходимые функции, характерные для дикого типа, т. е. определенный уровень компактизации или декомпактизации. Уменьшение дозы молекул белков-компактизаторов до одной должно приводить к ослаблению компактизации участка хромосомы и усилению активности гена. В результате происходит супрессия эффекта положения. Эти же

белковые молекулы в трех дозах будут сильнее компактизовать хроматин и, следовательно, усиливать эффект положения. Аналогичные рассуждения можно привести о белках — декомпактизаторах хроматина (см. рис. 10.9).

10.2.6. Механизмы гетерохроматинизации

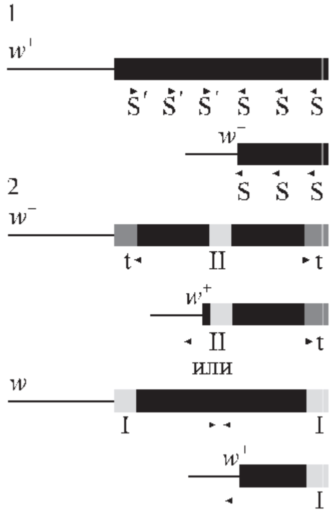
Существуют две основные точки зрения на механизмы генетической инактивации при эффекте положения мозаичного типа: во-первых, полагают, что изменения в структуре хроматина делают ген нечувствительным к регуляторным факторам, во-вторых, по мнению других исследователей, в результате хромосомных перестроек происходят изменения в компартментализации клеточного ядра. В соответствии с последней теорией хромосомы располагаются в специфических ядерных объемах и факторы сайленсинга и транскрипции распределяются в ядре неравномерно. Поэтому перемещение гена из одной ядерной территории в другую может влиять на его активность.

Данные в поддержку представлений о компартментализации получены в опытах с одновременным использованием хромосомных перестроек и транспозонов. Например, ген *white*$^+$, заключенный в транспозон, который локализован в теломерном районе короткой четвертой хромосомы, сильно инактивирован. Однако, если, используя транслокации, переместить концевой материал четвертой хромосомы на конец более длинной второй хромосомы, т. е. в положение, более удаленное от гетерохроматина, инактивация гена *white*$^+$ значительно ослабнет [Wallrath, 1998].

Распространены гипотезы об инактивирующем влиянии гетерохроматина на ген, перенесенный к нему хромосомной перестройкой.

Почему при перенесении гена в гетерохроматин происходит компактизация участка хромосомы и, как следствие, инактивация гена? Наиболее разумными кажутся гипотезы К. Тартофа и его коллег (рис. 10.10). В соответствии с моделью 1 блок гетерохроматина состоит из последовательностей ДНК, которые и являются собственно гетерохроматиновыми. При этом они направлены навстречу друг другу и уравновешивают друг друга. При перенесении к ним гена, например w^+, он может вовлекаться в компактизацию вместе с одним доменом гетерохроматина. Однако, по мнению самих авторов, эта модель не дает объяснения того, каким образом инактивация распространяется на большие расстояния — в несколько десятков дисков политенных хромосом.

Рисунок 10.10



Модели инактивации генов при эффекте положения мозаичного типа
[Tartof et al., 1989. — Из: Жимулёв, 1993. С. 366]

Альтернативной является модель 2, согласно которой края гетерохроматиновых доменов должны быть определены. Они могут начинаться с сайтов инициации (I), а заканчиваться сайтами терминации (t). Вся ДНК, заключенная между этими сайтами, компактизуется, и, таким образом, участок хромосомы гетерохроматинизируется. Один из вариантов этой модели — отсутствие терминаторов, если сайты инициации ориентированы навстречу друг другу (см. рис. 10.10). Компактизация, начавшись с инициатора, переходит и на эухроматиновую часть хромосомы.

Итак, эффект положения — это распространение неактивного состояния гетерохроматина на эухроматин, приближенный к нему хромосомной перестройкой. Следовательно, инактивированное состояние прицентромерного гетерохроматина, а также гетерохроматинизированного эухроматина при эффекте положения определяется общими причинами.

Как может реализоваться гипотеза Тартофа? В настоящее время можно считать общепринятым представление, согласно которому неактивное, суперкомпактное состояние прицентромерного гетерохроматина обеспечивается сложными белковыми комплексами. Эти комплексы начинают формироваться в «центрах» инактивации, т. е. на последовательностях ДНК, которые имеют повышенную возможность связываться с этими белками (гипотетически, пока «центры» не выявлены и их специфика не ясна), а затем растут подобно кристаллу, благо-

даря кооперативному эффекту (когда присоединение первых белковых молекул резко усиливает присоединение последующих и т. д.). В результате мультимерный (состоящий из многих молекул разных белков) комплекс распространяется на большие расстояния, упаковывая хромосомную нить в неактивные блоки — домены гетерохроматина. Согласно этой модели, генетическая инактивация при эффекте положения объясняется довольно просто: хромосомная перестройка разрывает ДНК в пределах домена и переносит ген в сферу действия компактизации, которая, начавшись с инициатора, переходит и на приблизившуюся эухроматиновую часть хромосомы. Поскольку при нарушении естественной границы между эу- и гетерохроматином в результате перестройки не происходит остановка в движении белков, они распространяются на «нового» эухроматинового соседа, присоединившегося к гетерохроматину в результате перестройки. В этой схеме много гипотетичного, так, «центры» инактивации и терминаторы не выявлены как специфические последовательности. Однако в пользу их существования косвенно говорят те факты, что не всякая перестройка вызывает эффект положения.

Каким образом влияет на инактивацию генов и на компактизацию районов хромосом варьирование количества гетерохроматина в ядре?

Компактизующие белки играют существенную роль в упаковке материала гетерохроматина. При удалении из генома *Y*-хромосомы (т. е. значительной части гетерохроматина) белки компактизации, не имеющие теперь адекватного количества гетерохроматина, т. е. мишеней для связывания, более плотно упаковывают оставшийся прицентромерный гетерохроматин и, соответственно, присоединенный к нему участок эухроматина. До сих пор совершенно не понятно, почему эти процессы происходят мозаично, т. е. в одной из рядом расположенных клеток развивается МЭП, а в другой — нет.

Вопросы формирования гетерохроматина — это бурно развивающаяся область, где очень быстро появляется множество новых фактов. Казалось бы, инактивация гетерохроматина в развитии связана с тем, что он представлен в основном повторами некодирующей ДНК. Их инактивация страхует клетку от экспрессии ненужного ей материала, а в специализированных тканях с политенными хромосомами способствует их недорепликации, что также выгодно клеткам.

Исследования эффекта положения мозаичного типа у дрозофилы привели к важным общегенетическим заключениям:

1. В основе особой структуры гетерохроматина действительно лежит более плотная компактизация, которая инициируется в определеных центрах гетерохроматина и распространяется при участии специальных компактизующих белков. Сила компактизации, исходящая от гетерохроматина, столь велика, что распространяется и на эухроматин, когда он переносится в окрестности гетерохроматина.

2. Явление мозаичного эффекта положения представляет собой замечательную модель для изучения действия белков, изменяющих состояние компактизации хроматина. Изучение модификаторов эффекта положения позволяет провести генетический анализ компонентов хроматина.

Литература к разделам 10.2.1–10.2.6

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. В 5 т. Т. 2. М.: Мир, 1994. С. 287–301.

Гвоздев В. А., Алаторцев В. Е., Аравин А. А. и др. Гетерохроматин: молекулярная эволюция и эффекты положения генов у *Drosophila melanogaster* // Молекулярная биология. 1999. Т. 33. С. 14–25.

Дубинин Н. П., Сидоров Б. Н. Эффект положения гена *hairy* // Биологический журн. 1935. Т. 4, № 3. С. 555–563.

Дубинин Н. П. Новый тип эффекта положения генов // Биологический журн. 1936. Т 5, № 5. С. 851—866.

Жимулёв И. Ф. Явление эффекта положения и исследования В. В. Хвостовой // Эффект положения гена в исследованиях В. В. Хвостовой. Новосибирск: Изд. Ин-та цитологии и генетики СО РАН. 1992. С. 5–22.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 490 с.

Жимулёв И. Ф., Беляева Е. С., Мальцева Н. И., Большаков В. Н. Изменения проявления свойств интеркалярного гетерохроматина у *Drosophila melanogaster* под влиянием модификаторов эффекта положения // Генетика. 1989. Т. 25. С. 1589–1598.

Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster.* III. Continuous and discontinuous compaction of chromosomal material // Chromosoma. 1991. Vol. 100. P. 453–466.

Reuter G., Spierer P. Position effect variegation and chromatin proteins // BioEssays. 1992. Vol. 14. P. 605–612.

Struhl K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins // TIBS. 1989. Vol. 14. P. 137–140.

Wallrath L. L. Unfolding the mysteries of heterochromatin // Curr. Opin. Genet. Developm. 1998. Vol. 8. P. 147–153.

Zhimulev I. F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation // Advances in Genetics. 1998. Vol. 37. 555 p.

10.2.7. Эффект положения, вызываемый теломерным гетерохроматином

Генетическая инактивация под действием теломерного гетерохроматина была обнаружена у *Drosophila melanogaster* в 1984 г. в лабораториях В. Геринга и Дж. Рубина. Обе исследовательские группы использовали транспозон, содержащий ген *white*⁺. При встраивании такого транспозона в прителомерные повторы ген *white*⁺ инактивируется, демонстрируя мозаичность.

В проявлениях эффекта положения под действием теломерного и прицентромерного гетерохроматина много общего. Различия заключаются в том, что генетическая инактивация от теломерного гетерохроматина варьирует под действием других генетических модификаторов. Так, ген *Su(var)2–5* не влияет на выраженность МЭП теломерного гетерохроматина. Однако этот тип МЭП супрессируется мутациями генов *Su(z)2* и *Psc* (*Posterior sex combs*).

Литература к разделу 10.2.7

Cryderman D. C., Morris E. J., Biessmann H. et al. Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organisation and chromatin structure play critical roles // The EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3724–3735.

10.2.8. Эффект положения мозаичного типа у других организмов

Эффект положения мозаичного типа обнаружен у ряда других объектов. Лучше всего он изучен у дрожжей. Ген *ADE2* нормально экспрессируется во всех клетках, когда он занимает нормальное положение в средней части хромосомы. Эти клетки образуют колонии белого цвета (рис. 10.11). Если ген *ADE2* инактивируется, блокируется путь биосинтеза аденина, что в свою очередь приводит к накоплению красного пигмента. Образуется колония, состоящая из красных клеток. Инактивация гена *ADE2* происходит при перемещении его в окрестности теломерного гетерохроматина. Белые секторы по краям красной колонии представляют собой клоны клеток, в которых произошла спонтанная реактивация гена *ADE2*. Ген инактивируется, несмотря на наличие в клетках всех белков, необходимых для его активирования. ДНК около теломерных концов дрожжевой хромосомы упакована в особенно недоступную для белков форму хроматина. И этот процесс образования особой упаковки, ответственной за поддержание транслоцированного гена *ADE2* в неактивном состоянии, называется сайленсингом или молчанием (silencing). Находки таких секторов указывают, что как активное, так и неактивное состояния *ADE2* эпигенетически наследуются.

Рисунок 10.11

Эффект положения мозаичного типа по гену *ADE2* у дрожжей [Alberts et al., 1994. P. 435]

Похожая ситуация, когда генетическая инактивация происходит при перенесении гена в теломерный район, была обнаружена у *Trypanosoma brucei, Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; у *S. cerevisiae* — когда ген перенесен к инактивированному гену, контролирующему тип скрещивания; у *S. pombe* и млекопитающих — при перенесении в прицентромерные районы хромосом. Все эти факты получены недавно: в период с 1994 по 1998 г.

Литература к разделу 10.2.8

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. В 5 т. Т. 2. М.: Мир, 1994. С. 287–301.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 435.

Cryderman D. C., Morris E. J., Biessmann H. et al. Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organisation and chromatin structure play critical roles // The EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3724–3735.

10.3. ЭФФЕКТ ДУБИНИНА

В 1934 г. Н. П. Дубининым и Б. Н. Сидоровым был впервые описан необычный случай эффекта положения, связанный с геном *cubitus interruptus* (*ci*). Ген ci^+ локализован на границе эу- и гетерохроматина 4-й хромосомы. Рецессивная мутация ci^1 в гомозиготе приводит к прерывистости кубитальной жилки крыла L4. Если в результате хромосомных перестроек (*R*) ген ci^+ переносится в эухроматиновые районы, то часть гетерозигот $R(ci^+)/ci^1$ имеет мутантный фенотип. Это и есть эффект Дубинина (ЭД).

В 1939 г. В. В. Хвостова (рис. 10.12) обнаружила интересную особенность. По каким-то причинам в проксимальных районах хромосом (почти в четверти длины каждого плеча) ЭД супрессирован: транслокация гена ci^+ в эти районы не приводит к его инактивации. Перенос гена ci^+ в более дистальные районы может вызывать сильный ЭД (рис. 10.13). Понять природу ЭД оказалось непросто. Некоторые авторы рассматривали его как случай эффекта положения мозаичного типа гетерохроматинового гена, особенно после того, как было показано влияние *Y*-хромосомы на проявление *ci*-эффекта. Но есть и отличия от МЭП. При МЭП в части клеток происходит инактивация нормального аллеля гена в хромосоме с перестройкой, помещающей этот ген в область гетерохроматина. Поэтому у гемизигот по перестройке проявляется мозаичный эффект (см. рис. 10.2). А вот гемизиготы $R(ci^+)/0$, имеющие только один гомолог четвертой хромосомы, и гомозиготы $R(ci^+)/R(ci^+)$ не отличаются от мух дикого типа. Отсюда возникло предположение, что эффект Дубинина зависит от соматической конъюгации нормального и перестроенного гомологов 4-й хромосомы. Это объединяет ЭД с другим типом эффекта положения — так называемыми trans-sensing эффектами. В эту группу К. Тартоф и С. Хеникофф в 1991 г. предложили объединить ряд сложных генетических явлений, таких как трансвекция, *z–w*-взаимодействие, доминантный эффект положения гена *brown* и др. В их основе лежит зависимость экспрессии ряда генов от соматической конъюгации гомологов в интерфазном ядре. Хромосомные перестройки, нарушающие конъюгацию гомологов, приводят к изменению регуляции экспрессии таких генов. В отличие от МЭП, trans-sensing эффекты проявляются только в определенных гетерозиготных комбинациях аллелей гена. Таким образом, своеобразие эффекта Дубинина в том, что одни его проявления типичны для trans-sensing эффектов, другие — для МЭП.

Дальнейший прогресс в понимании природы ЭД связан с изучением молекулярно-генетической организации гена *ci* и регуляции его экспрессии.

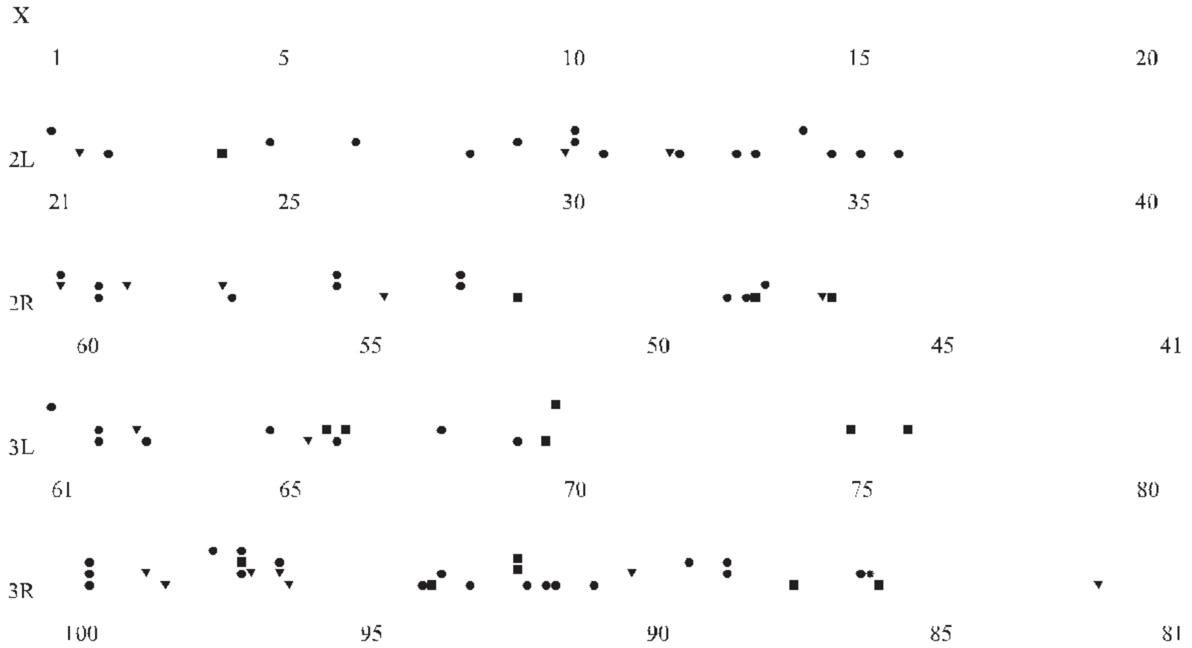
Выяснилось, что ген *ci* относится к группе генов раннего эмбриогенеза, которые контролируют формирование полярности сегментов эмбриона. Его продукт, белок CI, является фактором транскрипции. В норме его экспрессия ограничена только передними отделами эмбриональных сегментов и имагинальных дисков. В регуляции экспрессии гена большую роль играет ген *engrailed* (*en*), который отвечает за негативную регуляцию экспрессии гена *ci* в задних отделах сегментов и имагинальных дисков.

Ген *ci* представлен несколькими группами мутаций, как летальных, так и морфологических, объединенных сложными межаллельными отношениями. Группа рецессивных крыловых мутаций, в которую входит и ci^1, связана с нарушениями в маленьком участке регуляторной

Рисунок 10.12

Вера Вениаминовна Хвостова
(1903–1977)

Рисунок 10.13



Локализация точек разрывов транслокаций, переносящих четвертую хромосому в районы аутосом и *X*-хромосомы, в результате чего образуется сильный эффект положения гена *ci* [Жимулёв, 1993. С. 311]. Суммированы данные Хвостовой 1939 г. (светлые кружки) и более поздних авторов (другие символы). Хорошо заметно, что нет или почти нет хромосомных перестроек в районах 37–40 2L-хромосомы, 41–46 2R-хромосомы, 78–80 3L-хромосомы, 81–85 3R-хромосомы

зоны гена. Показано, что именно с этим участком связывается белок EN. Повреждения фрагмента ДНК длиной 1,4 тпн приводят к нарушению негативной регуляции экспрессии гена в крыловом имагинальном диске: у всех мутантов группы ci^1 белок экспрессируется как в переднем, так и в заднем отделе диска. Кстати, из заднего отдела имагинального диска и развиваются жилки крыла L4 и L5. Полагают, что белок EN может регулировать экспрессию ci^+ и в *цис*-, и в *транс*-положении. В связи с этим Локк и Тартоф в 1994 г. предположили, что ЭД является следствием нарушения *транс*-зависимой негативной регуляции в расконъюгированных гомологах четвертой хромосомы.

Недавно О. В. Демаковой были получены некоторые подтверждения этой гипотезы. Она провела сравнительный анализ жизнеспособности и фенотипа гетерозигот по ряду транслокаций, вызывающих сильный ЭД, и всем известным аллелям гена. Оказалось, что такие гетерозиготы жизнеспособны, т. е. ген в перестройках $R(ci^+)$ не инактивирован. ЭД проявляют гетерозиготы по всем крыловым рецессивным мутациям группы ci^1, т. е. этот эффект действительно обусловлен определенными межаллельными отношениями.

Кроме того, она провела цитологический анализ двух групп транслокаций. Одни переносили ген *ci* в дистальные районы хромосом и вызывали сильный ЭД, другие, напротив, переносили ген в проксимальные районы, где у гетерозигот $R(ci^+)/ci^1$ эффект практически не проявлялся. Выяснилось, что в перестройках второй группы транслоцированный гомолог 4-й хромосомы гораздо чаще связан эктопическими контактами с прицентромерным гетерохроматином. Значительно выше во второй группе и частота восстановления соматической конъюгации транслоцированного и нормального гомологов 4-й хромосомы. Таким образом, удалось получить прямое цитологическое подтверждение зависимости ЭД от соматической конъюгации гомологов четвертой хромосомы.

Литература к разделу 10.3

Демакова О. В. Цитологический анализ эффекта положения мозаичного типа и эффекта Дубинина у *Drosophila melanogaster*: Канд. дис. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики, 1998. 130 с.

Дубинин Н. П., Сидоров Б. Н. Зависимость действия гена от его положения в системе // Биологический журн. 1934. Т. 3, вып. 2. С. 304–331.

Дубинин Н. П., Соколов Н. Н., Тиняков Г. Г. Цитогенетический анализ эффекта положения // Биологический журн. 1935. Т. 4, вып. 4. С. 707–720.

Жимулёв И. Ф. Явление эффекта положения и исследования В. В. Хвостовой // Эффект положения гена в исследованиях В. В. Хвостовой. Новосибирск: Изд. Ин-та цитологии и генетики, 1992. С. 5–22.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 309–313.

Хвостова В. В. Роль инертных частей хромосом в эффекте положения гена *cubitus interruptus* у *Drosophila melanogaster* // Изв. АН СССР. 1939. Т. 4. С. 541–574. (Сер. биол. наук).

Dubinin N. P., Sidorov B. N. Relation between the effect of a gene and its position in the system // Amer. Natur. 1934. Vol. 68. P. 377–381.

Ephrussi B., Sutton E. A reconsideration of the mechanism of position effect // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1944. Vol. 30. P. 183–197.

Locke J., Tartof K. D. Molecular analysis of *cubitus interruptus* (*ci*) mutations suggests an explanation for the unusual *ci* position effects // Mol. Gen. Genet. 1994. Vol. 243. P. 234–243.

Schwartz C., Locke J., Nishida C., Kornberg T. B. Analysis of *cubitus interruptus* regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks // Development. 1995. Vol. 121. P. 1625–1635.

Tartof K. D., Henikoff S. Transsensing effects from *Drosophila* to humans // Cell. 1991. Vol. 65. P. 201–203.

Глава 11
УПАКОВКА ДНК В ХРОМОСОМАХ

В клетках не бывает чистой ДНК. На всех этапах клеточного цикла молекулы ДНК в той или иной степени упакованы в нуклеопротеиновые структуры. При этом ДНК эукариотической клетки при формировании митотической хромосомы упаковывается в несколько тысяч раз «с такой точностью, что в каждом клеточном цикле воспроизводятся размеры хромосом, отношения плеч, особенности продольной дифференциации, подразделение на эу- и гетерохроматин, а также полосы, возникающие при дифференциальном окрашивании» [Gatti et al., 1983. P. 83].

Несомненно, что в основе этой точности лежит какой-то удивительный по надежности механизм компактизации.

11.1. НУКЛЕОСОМЫ

В 1974 г. сразу четверо исследователей показали наличие нуклеосом в составе хроматина ядра: Р. Д. Корнберг обнаружил, что хроматин состоит из субъединиц, содержащих по 200 пн ДНК и по две молекулы 4 типов гистонов, М. Нолль изолировал эти структуры, а А. Олинс и Д. Олинс опубликовали первые электронно-микроскопические фотографии нуклеосом.

Фундаментальная субъединица хроматина — нуклеосома имеет один и тот же тип организации у всех эукариот. Нити нуклеосом находят в ядрах, обработанных растворами низкой ионной силы. Индивидуальные нуклеосомы получают в результате переваривания хроматина микрококковой нуклеазой — эндонуклеазой, разрезающей нить ДНК между нуклеосомами.

Каждая нуклеосома содержит примерно 200 пн ДНК, связанной с октамерной частицей, состоящей из белков-гистонов — по две копии H2A, H2B, H3 и H4. Это сердцевинные (коровые) гистоны. Молекула гистона H1 является мономером, она расположена снаружи нуклеосомы, так как ее удаление не влияет на структуру частицы (рис. 11.1).

Нуклеосома имеет форму цилиндра, вокруг которого ДНК делает два оборота. При этом участок, на котором ДНК «входит» на нуклеосому, пространственно очень близок к участку, где она «сходит» с нуклеосомы (рис. 11.2). На один оборот вокруг кора уходит 80 пн ДНК, в результате чего сайты, удаленные друг от друга на 80 пн в линейной ДНК, на поверхности нуклеосомы лежат рядом.

Участок ДНК между двумя нуклеосомами называется линкером. Нить ДНК длиной 146 пн обматывается вокруг октамера, еще около 50 пн приходится на линкер.

Более 90 % ДНК в клетке присутствует в составе нуклеосом. После упаковки ДНК в нуклеосомные структуры линейная длина фибриллы уменьшается в 6 раз.

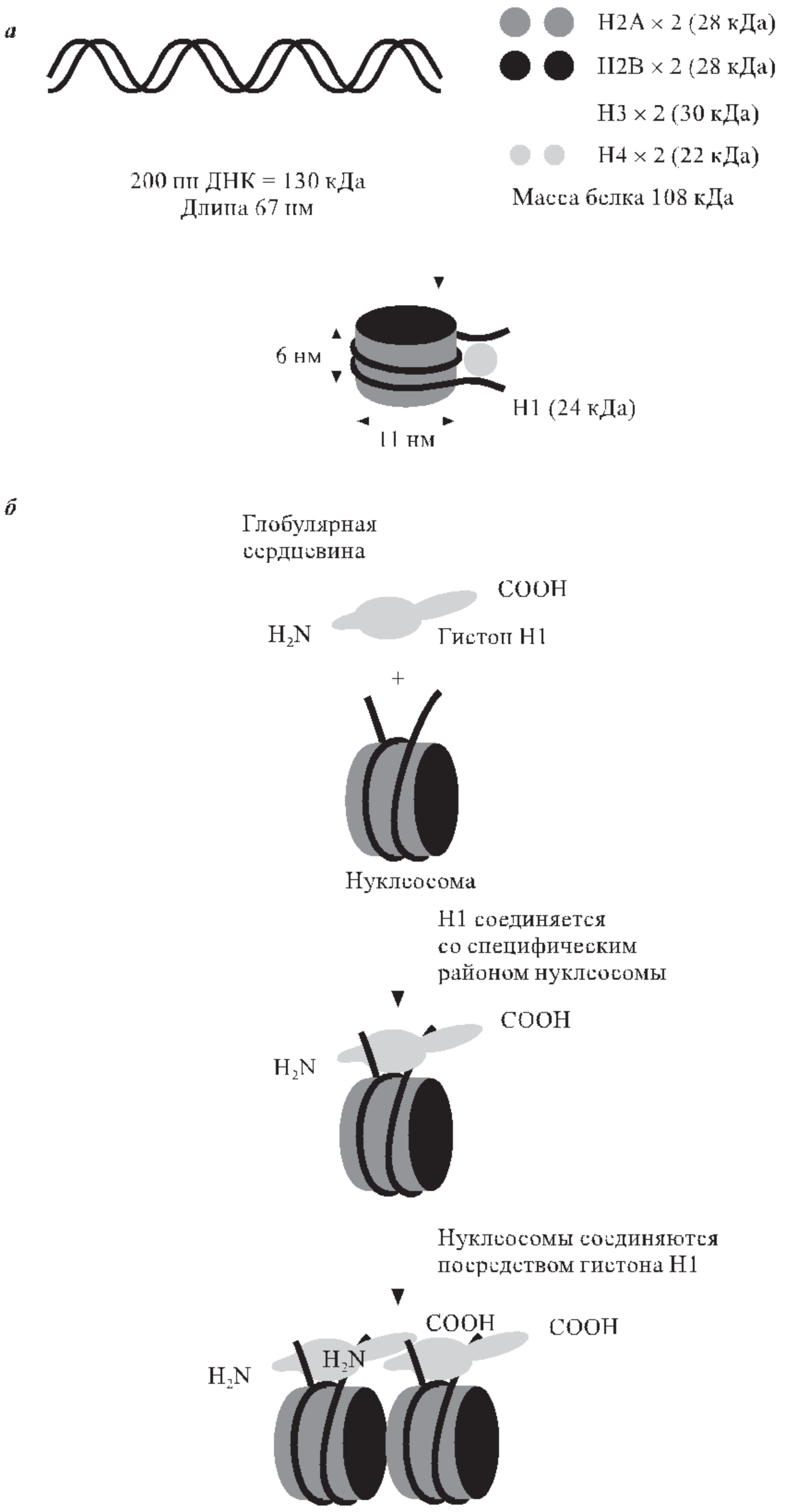
Когда изучают ультраструктуру хроматина под электронным микроскопом, обычно находят два типа нуклеопротеиновых нитей: 10 нм и 30 нм в диаметре. В первой нуклеосомы расположены друг за другом, вторая представляет собой спираль, свернутую из нити диаметром 10 нм. В каждом витке спирали находится 6 нуклеосом (рис. 11.3).

В фибрилле диаметром 30 нм коэффициент упаковки ДНК составляет примерно 36–40, т. е. каждый микрометр вдоль оси этой нити содержит 36–40 мкм линейной ДНК.

Дополнение 11.1

Нобелевская премия 1982 г. была присуждена А. Клугу (A. Klug) за его вклад в анализ кристаллической структуры нуклеосом.

Рисунок 11.1



Структура нуклеосомы (*а*) [Lewin, 2000. P. 569] и взаимодействие гистона H1 и нуклеосом (*б*) [Alberts et al., 1994. P. 346]

Рисунок 11.2

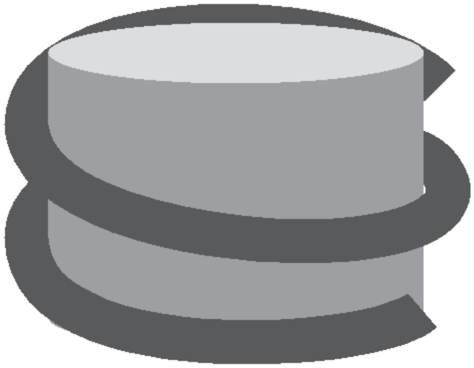
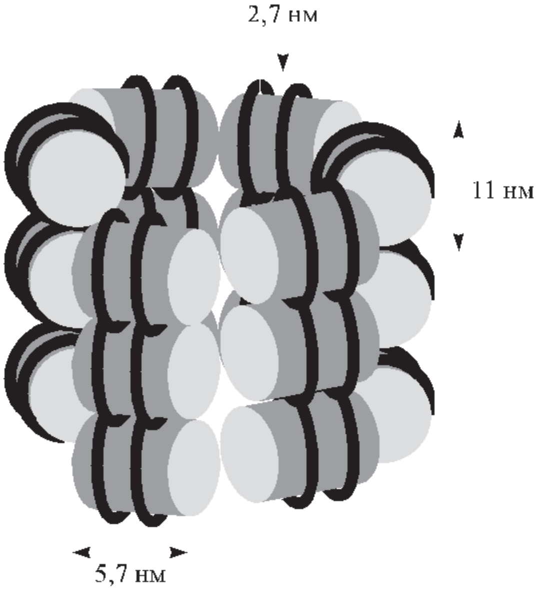


Схема расположения ДНК (нить темного цвета) на белковой глобуле (коре) [Lewin, 2000. P. 570]

Рисунок 11.3

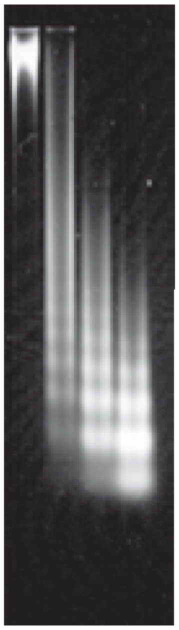


Структура нити хроматина диаметром 30 нм [Lewin, 1994. P. 812]

В результате обработки хроматина микрококковой нуклеазой и последующего разделения в электрофорезе обычно выявляется картина, называемая «лестницей» (рис. 11.4): на фореграмме видны полосы, длина пробега которых от старта электрофореза изменяется кратно длине ДНК в одной нуклеосоме — обычно 200 пн. Такой размер имеют ~90 % нуклеосом, хотя бывают нуклеосомы с размером ДНК 154 пн (у грибов) и 260 пн (в сперме морского ежа).

«Лестница» образуется из-за того, что не все линкеры оказались разрезанными нуклеазой,

Рисунок 11.4



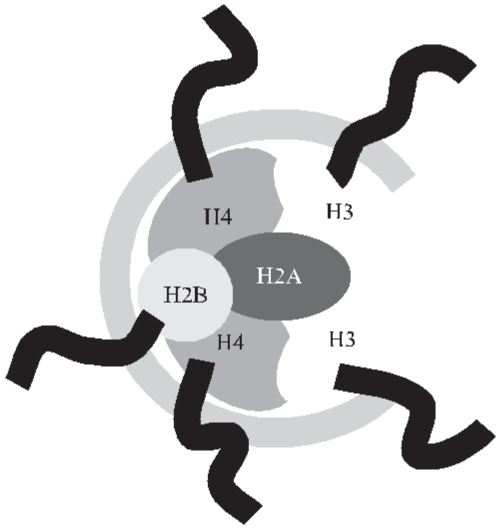
«Лестница» нуклеосом после обработки хроматина из личинок дрозофилы микрококковой нуклеазой и разделения в электрофорезе [Schwartz et al., 2000]

поэтому фракция с размером 200 пн представляет мономеры, 400 пн — димеры, 600 пн — тримеры и т. д.

В пределах нуклеосом молекулы гистонов занимают определенное положение (рис. 11.5). Все гистоны могут модифицироваться за счет ковалентного связывания определенных молекул со свободными группами аминокислот. Свободные аминогруппы лизина могут подвергаться ацетилированию и метилированию. В результате удаляется положительный заряд —NH_3^+. Метилироваться могут также аргинин и гистидин. Фосфорилирование происходит по гидроксильной группе серина, а также по гистидину. Это вносит фосфатную группу с дополнительным отрицательным зарядом. Изменение заряда белковой молекулы может повлиять на функциональные свойства всего октамера. Такие изменения в структуре хроматина происходят во время репликации и транскрипции или на других стадиях клеточного цикла. Например, фосфорилирование серина в положении 10 в гистоне H3 происходит, когда хромосомы конденсируются в митозе.

Не совсем ясным остается вопрос о том, всегда ли специфические последовательности ДНК находятся в определенных позициях в нуклеосоме (феномен, называемый позиционированием или фазированием нуклеосом).

Рисунок 11.5



Расположение молекул гистонов в нуклеосоме [Lewin, 2000. P. 582]

Глобулярные части гистонов расположены в октамере сердцевины, локализация N-терминальных «хвостов» (показаны толстыми черными линиями), несущих сайты, необходимые для модификаций, не совсем точно определена и достаточно подвижна

Рисунок 11.6

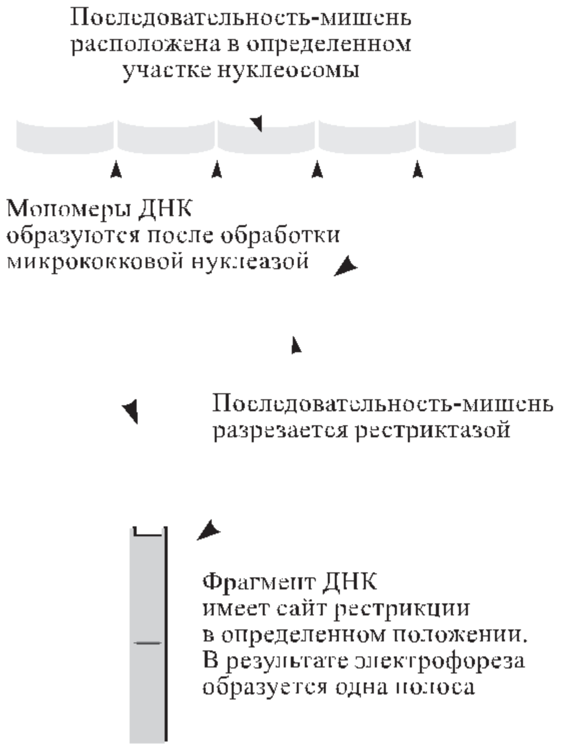


Схема эксперимента для установления наличия фазирования нуклеосом [Lewin, 2000. P. 587]

In vitro нуклеосомы собираются независимо от того, какие последовательности ДНК присутствуют в системе. А как *in vivo*?

Ставили следующий опыт: нить с нуклеосомами расщепляли микрококковой нуклеазой, при этом получали мономерные фрагменты. Если теперь изолировать ДНК и обработать рестриктазой, которая имеет единственный сайт узнавания в этом мономере, то получатся два фрагмента ДНК определенного размера. Продукты этого двойного переваривания разделяют в геле с помощью электрофореза. Затем, используя зонд, представляющий собой последовательность по одну сторону от сайта рестрикции, выявляют соответствующий фрагмент. Если на фореграмме один фрагмент, то нуклеосомы фазированы (рис. 11.6).

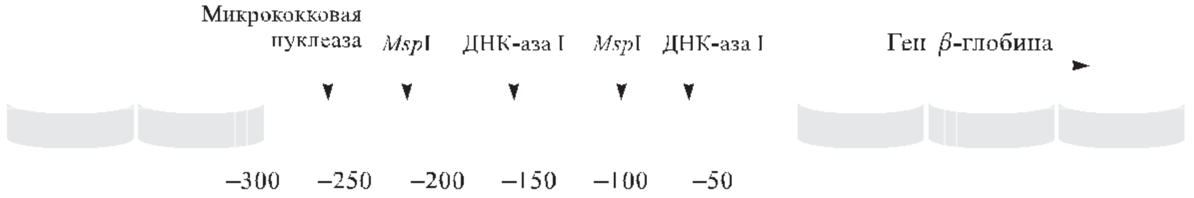
Однако картина изменится, если позиционирования нет. В этом случае линкеры будут состоять из разных последовательностей ДНК в каждой копии генома, и указанные выше рестрикционные сайты будут располагаться всякий раз на разном расстоянии от линкера. В результате на фореграмме образуется широкий мазок — от минимального выявляемого фрагмента ДНК (20 пн) до мономерной нуклеосомы.

Сейчас ясно, что расположение нуклеосом по длине гена не случайно и во многом определяется спецификой последовательностей ДНК.

Не совсем понятно, сохраняется ли нуклеосомная укладка, когда ген начинает транскрибироваться. В неделящемся ядре, где гены активно работают, нуклеосомы расположены достаточно строго в определенных точках в промоторной области. Присутствие нуклеосом вместо факторов транскрипции в области промотора подавляет активность генов. Белки нуклеосом — гистоны конкурируют с факторами транскрипции за участки свободной от белков ДНК. Такие участки могут образовываться в клетке сразу после репликации ДНК. Если гистоны успеют образовать нуклеосомные структуры в условиях, когда концентрация факторов транскрипции недостаточна, то ген оказывается неактивным (репрессированным). Наоборот, при достаточной концентрации факторов они успешно конкурируют с гистонами и в области промотора образуют специфичную структуру, примыкая к РНК-полимеразе.

В то же время гистоны не сходят полностью с ДНК даже в активно транскрибируемом хроматине. В некоторых генах, например в блоках генов рибосомной 18S и 28S РНК, нуклеосомная укладка исчезает почти полностью — примерно на 85 %. С другой стороны, транскрипционные комплексы мини-хромосом ви-

Рисунок 11.7



Гиперчувствительный участок гена β-глобина кур содержит сайты, подверженные перевариванию несколькими нуклеазами [Lewin, 1994. P. 829]

руса SV40, выделенные из инфицированных клеток, содержат нормальный набор гистонов и имеют нуклеосомную структуру, однако интенсивность транскрипции у этого вируса существенно ниже, чем в генах рРНК.

Совокупность современных данных свидетельствует о том, что транскрибируемые гены содержат нуклеосомы с той же частотой, что и нетранскрибируемые. Другими словами, гены не подвергаются серьезной структурной реорганизации в ходе транскрипции. Однако в области инициации транскрипции структурные изменения хроматина все-таки обнаружены.

Изменения структуры хроматина улавливаются после обработки очень низкими концентрациями ДНК-азы I, которая деградирует незащищенные белками участки ДНК до моно- и динуклеотидов. После обработки ферментом образуются разрывы в участках, называемых гиперчувствительными к ДНК-азе I. В этих сайтах ДНК не организована в нуклеосомные структуры и примерно в 100 раз более чувствительна к обработке ферментом, чем обычный хроматин. Каждый ген имеет 1–2 участка, чувствительных к ДНК-азе I, расположенных чуть выше зоны промотора. В некоторых случаях промоторный участок обладает повышенной чувствительностью к разным нуклеазам (рис. 11.7).

Гиперчувствительные сайты, связанные с транскрипцией, могут образовываться под влиянием факторов транскрипции.

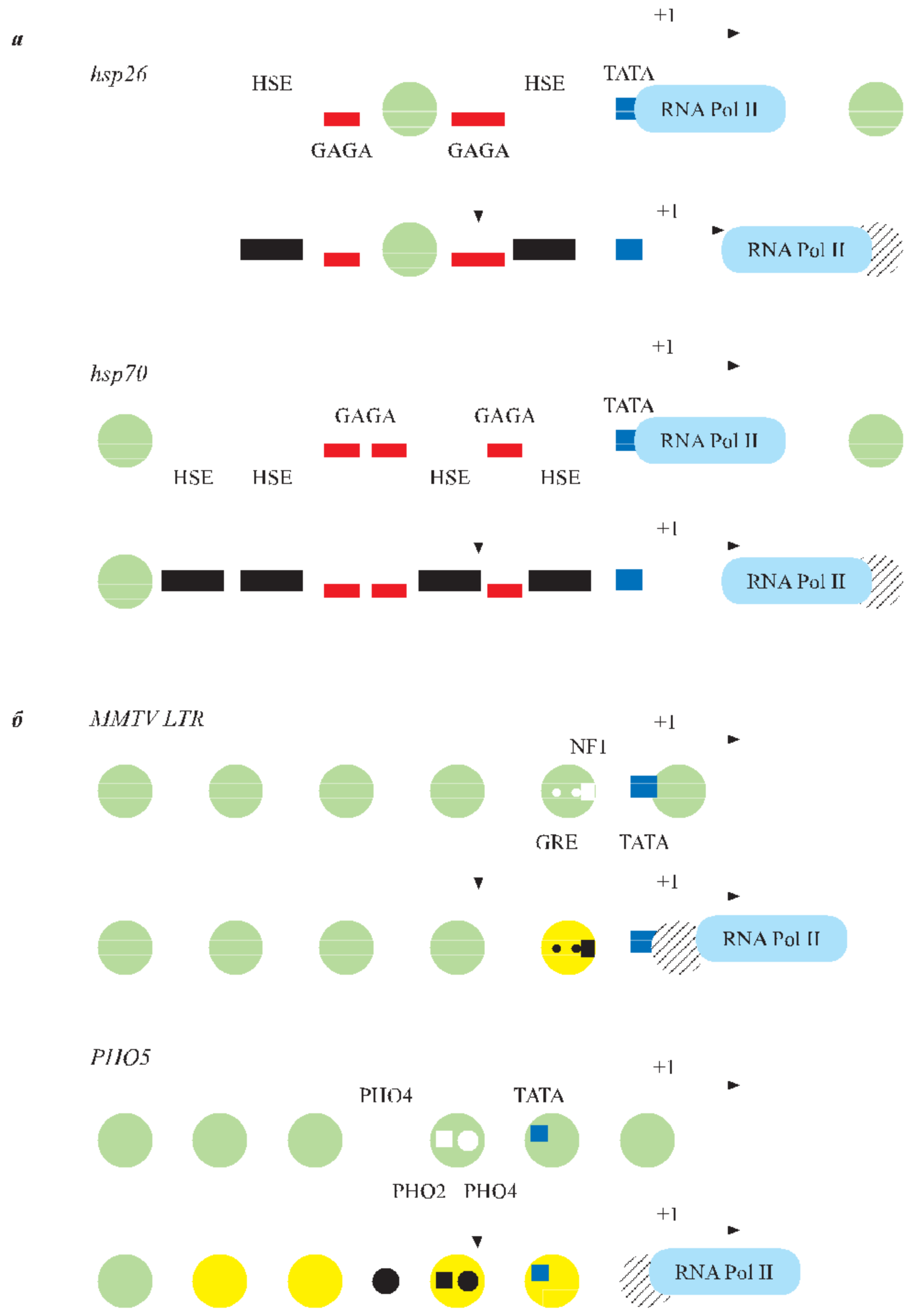
Можно выделить два типа генов по организации их промоторов: предустановленные (preset) и реконструирующиеся (remodeling) (рис. 11.8). Предустановленные гены — это такие гены, в которых промоторные сайты связывания *транс*-действующих факторов доступны этим факторам (т. е. они находятся в ненуклеосомном состоянии, гиперчувствительном к ДНК-азе I) еще до начала активации гена. В ходе активирования гена регулирующие факторы связываются с *цис*-действующими регуляторными элементами и запускают процесс транскрипции без заметных изменений в хроматиновой структуре промоторного района. Напротив, в реконструирующихся генах некоторые из необходимых для активирования *цис*-действующих регуляторных элементов упакованы в нуклеосомы и поэтому недоступны. Нуклеосомы должны переформироваться в ответ на активирующий сигнал, чтобы *цис*-элементы стали доступными. В результате должны появиться участки, гиперчувствительные к ДНК-азе.

Ген *hsp26* является хорошим примером индуцируемого предустановленного гена (см. рис. 11.8, *а*). Он активируется в течение нескольких минут после начала теплового шока. До индукции в регуляторном участке гена находятся два сайта, гиперчувствительные к ДНК-азе I. Они локализованы в двух районах HSE. Рядом с ними расположены тракты из С- и Т-остатков (GAGA-район), непосредственно примыкающие к HSE. Они связываются с GAGA-фактором в системе *in vitro* и выявляются на футпринтах *in vivo*. РНК-полимераза II занимает участок до +25 и даже транскрибирует короткую молекулу РНК, однако после этого делает паузу. После индукции гена тепловым шоком белок HSF связывается с элементом HSE и РНК-полимераза II продолжает движение. Каких-либо изменений в структуре хроматина промотора не происходит. Похожим образом организован ген *hsp70*.

В промоторном районе гена *MMTV LTR,* функционирующего в клетках млекопитающих, находится 6 нуклеосом (см. рис. 11.8, *б*). В ходе индукции нуклеосома, расположенная в участке, с которым связываются индуцирующие факторы GRE и NF1, изменяется, этот участок становится гиперчувствительным к ДНК-азе I, и белок NF1 начинает связываться с ним.

У дрожжей промоторный район гена *PHO5* упакован в 6 нуклеосом. В зоне образования второй нуклеосомы от участка начала транскрипции расположен сайт связывания регуля-

Рисунок 11.8



Структура промотора и нуклеосомная укладка предустановленных (*а*) и реконструирующихся (*б*) генов [Wallrath et al., 1994]:

hsp26 и *hsp70* — гены белков теплового шока; *PHO5* и *MMTV LTR* — гены дрожжей и млекопитающих соответственно; зеленые круги — постоянные нуклеосомы; круги с косой штриховкой — нуклеосомы, расположенные ниже точки начала транскрипции; желтые круги — переформирующиеся нуклеосомы в регуляторной области генов; *цис*-действующие регуляторные элементы изображены прямоугольниками и кружками; участки, связавшие *транс*-активаторы, показаны черным; HSE, GAGA, GRE, NF1, PHO — сайты связывания различных регуляторных белков; TATA – TATA-домен; RNA PolII — РНК-полимераза II

тора PHO4. Есть слабый участок связывания с PHO4 между второй и третьей нуклеосомой. В присутствии фосфата происходит активация гена, во время которой четыре нуклеосомы реконструируются (см. рис. 11.8, *б*).

Литература к разделу 11.1

Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989. С. 85–104.

Aalfs J. D., Kingston R. E. What does «chromatin remodeling» mean? // TIBS. 2000. Vol. 25. P. 548–555.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 346.

Gatti M., Smith D. A., Baker B. S. A gene controlling condensation of heterochromatin in *Drosophila melanogaster* // Science. 1983. Vol. 221. P. 83–85.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 797–831.

Lewin B. Genes VII. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000. P. 567–615.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 330–331.

Wallrath L. L., Lu Q., Granok H., Elgin S. C. R. Architectural variations of inducible eukariotic promoters: present and remodeling chromatin structures // BioEssays. 1994. Vol. 16. P. 165–170.

Wolffe A. P., Pruss D. Deviant nucleosomes: the functional specialization of chromatin // Trends in Genetics. 1996. Vol. 12. P. 58–62.

11.2. НАДНУКЛЕОСОМНАЯ УКЛАДКА ДНК

Приведенные в табл. 11.1 данные расчетов дают представление о том, как упакована ДНК в различных ядерных структурах.

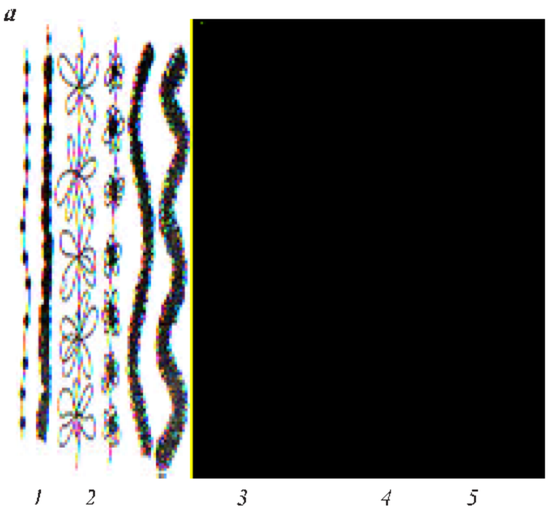
По-видимому, процесс компактизации ДНК, приводящий в конце концов к построению плотного тела митотической хромосомы, проходит через несколько структурных уровней (рис. 11.9). Первый уровень — нуклеосомный, обеспечивает сверхскручивание ДНК по поверхности гистоновой сердцевины. Второй — нуклеомерный (сверхбусина), где идет объединение 6 нуклеосом в глобулу. Так как эти этапы компактизации осуществляются на огромных линейных молекулах ДНК, то ряд сближенных нуклеомеров и образует 30-нанометровую фибриллу ДНП. Третий уровень — хромомерный: петли фибрилл ДНП, объединенные «скрепками» из негистоновых белков, образуют компактные тела (0,1–0,2 мкм), которые при искусственной деконденсации дадут розетковидные структуры. Расположение петлевых доменов и хромомеров может быть неравномерным: участки тела митотической хромосомы, обогащенные ими, могут соответствовать полосам при дифференциальной окраске хромосомы. Четвертый уровень — хромонемный: хромомеры сближаются и образуют толстые (0,1–0,2 мкм) нити, которые можно уже наблюдать и в световой микроскоп. Характер упаковки этой нити в теле хроматиды еще недостаточно выяснен: возможна спиральная укладка хромонемы, но не исключено и образование ею еще одного уровня петлевых структур. Конечно, такая общая схема организации митотических хромосом очень неполно отражает особенности строения их специализированных участков, таких как ядрышковый организатор, теломеры и центромеры.

В заключение этого обзора можно прийти к выводу, что при изучении ультраструктуры хромосом исследователи сталкиваются с парадоксальной ситуацией: чем ближе мы подходим к высшим структурным уровням организации митотических хромосом, тем меньшей по объе-

Таблица 11.1. Укладка ДНК, содержащейся в геноме дрозофилы, в различных ядерных структурах [Жимулёв, 1992. С. 235]

Структура	Длина (мкм)	Коэффициент упаковки	
		по отношению к предыдущему уровню	исходной молекулы ДНК
ДНК в геноме	35 000–56 000	—	—
Нуклеосома (нить диаметром 10 нм)	—	5–7	5–7
Нуклеомер (нить диаметром 25–30 нм)	—	5–7	25–49
Политенные хромосомы (эухроматиновая часть)	765–1150	1,2–1,5	30–73
Метафазная хромосома	7,5	90–210	6300

Рисунок 11.9



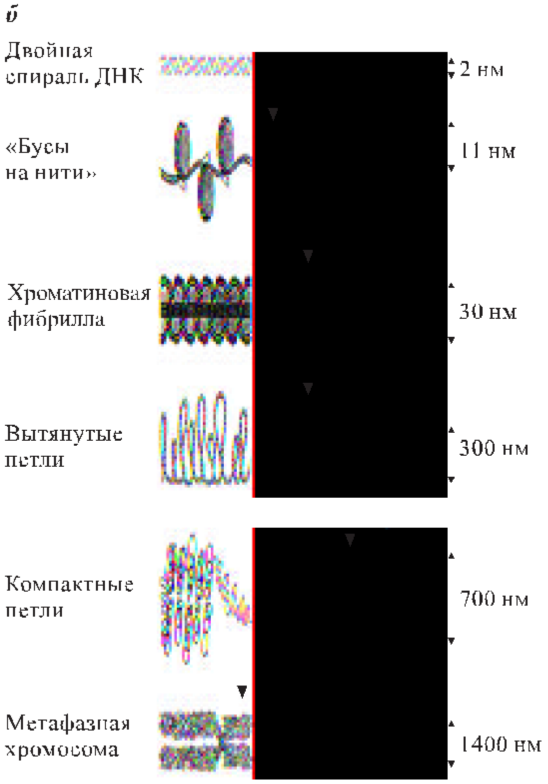
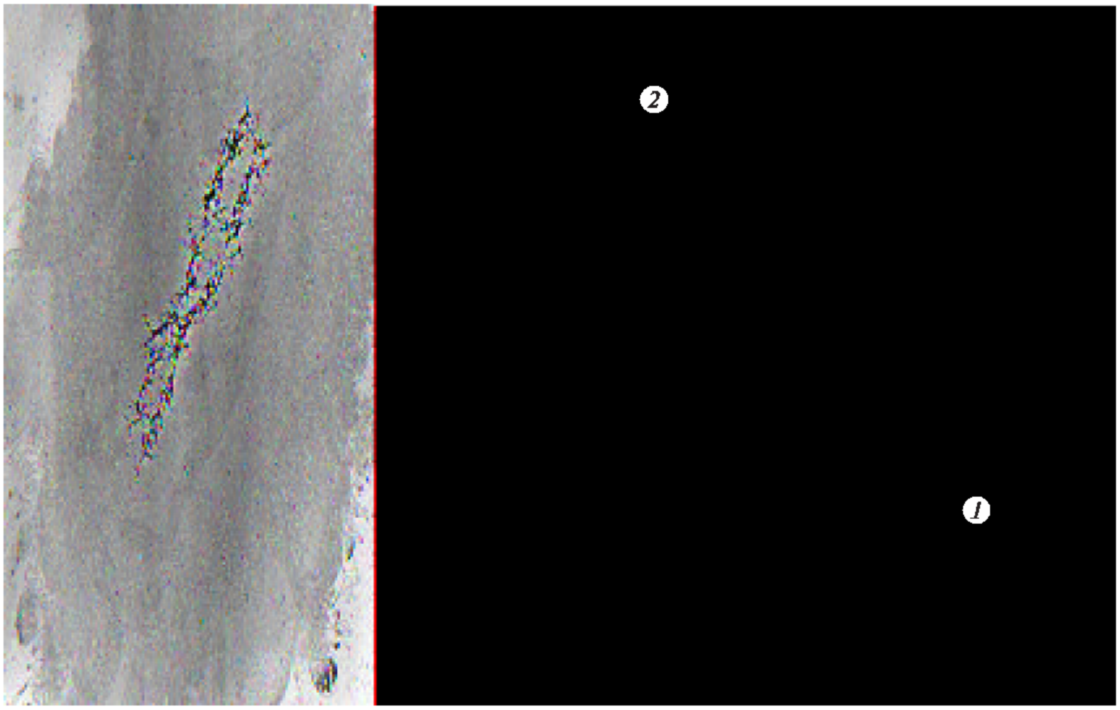


Схема различных уровней компактизации хроматина (*а*) [Ченцов, 1996] и размеры хромосомных фибрилл (*б*) [Russell, 1998. P. 333]:

1 — нуклеосомный уровень, 2 — нуклеомерный, 3 — хромомерный (петлевой домен, розетки), 4 — хромонемный, 5 — хроматидный

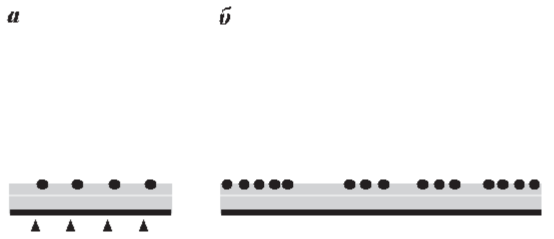
Рисунок 11.10



Латеральные петли ДНК (*1*) и осевые компоненты — скаффолд (*2*) метафазной хромосомы после полного удаления гистонов.

Фотография любезно предоставлена У. Леммли

Рисунок 11.11



Две модели закрепления оснований петель в ядерном матриксе [Razin, 1995. P. 431]:

а — простейшая модель, предполагающая, что петли разделены участками MAR, состоящими из относительно коротких фрагментов ДНК, погруженных в ядерный матрикс; *б* — модель, постулирующая, что петлевые районы относительно длинные.

Черными кружками обозначены районы, непосредственно взаимодействующие с белками матрикса

му и менее надежной становится информация об этой важнейшей клеточной структуре.

Большим шагом в моделировании структуры метафазной хромосомы оказалось изучение структуры хроматина после удаления гистонов из хромосом обработкой 2M NaCl. В таких случаях удаляются все гистоны и бóльшая часть негистоновых белков. После этой обработки на месте метафазной хромосомы остается остов (scaffold) из негистоновых белков, из которого выходят и распределяются в виде гало петлеобразные нити ДНК длиной 10–30 нм (рис. 11.10).

Центральный скаффолд сохраняет очертания метафазной хромосомы даже после полного переваривания ДНК нуклеазами. Петли, выходящие из него, часто называют петлевыми доменами. У человека одна из хромосом средних размеров имеет около 2000 петлевых доменов. Участки ДНК, связанные со скаффолдом, называются SAR (scaffold attachment regions). На рис. 11.11 показана схема образования петель, основания которых погружены в скаффолд из негистоновых белков.

В интерфазном ядре такие петли связаны с нитчато-сетчатым белковым образованием, расположенным внутри ядерной оболочки и называемым ядерным матриксом. Ядерный матрикс был открыт в 1960 г. Г. П. Георгиевым и Ю. С. Ченцовым.

Для выделения фрагментов ДНК, к которым прикрепляются белки матрикса (их называют MAR — matrix attachment regions), используют следующие процедуры: 1) выделяют клеточные ядра; 2) экстрагируют гистоны; 3) деградируют ДНК рестриктазами или ДНК-азой; 4) из оставшихся ДНК-белковых комплексов выделяют ДНК и анализируют.

Если обработать ДНК-азой препараты хромосом с петлями, то можно получить белковые остовы и проанализировать их состав. Оказалось, что в них присутствует около 20 видов белков негистоновой природы, сходных с белками интерфазного ядерного матрикса. Две фракции белков, с молекулярной массой 170 и 135 кДа, являются преобладающими. Белок 135 кДа представляет собой топоизомеразу II.

В последнее время получены данные, говорящие о том, что скаффолды могут представлять собой артефакт, получившийся в результате монтажа и высушивания дегистонизированных хромосом на подложке. Действительно, в теле хромосомы есть негистоновые белковые «скрепки», сшивающие основания боковых петель ДНК, но они разбросаны рыхло по объему хромосомы.

Аргументы против существования петель *in vivo*:

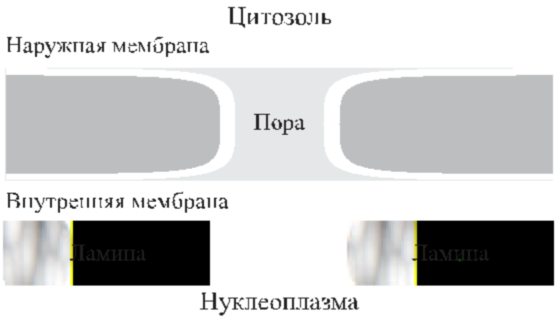
1. Скаффолды формируются только в экспериментальных условиях, и реальное существование их в нативных хромосомах не продемонстрировано.
2. Если скаффолд играет важную роль в организации каждой хромосомы, его морфология и структура должны быть неизменными, чего не наблюдают.
3. В метафазных хромосомах, окрашенных на белки, скаффолд не обнаружен.
4. Если хромосомы несколько диспергируются перед тем, как будут удалены гистоны, скаффолд впоследствии не образуется.

Как уже указывалось, при разных способах депротеинизации кроме петель на периферии набухших хромосом можно выявить и розеткоподобные структуры, состоящие из ДНК. Так, во время распластывания метафазных хромосом образуются розетки, составленные из многих петель, выходящих из общего центра. Многочисленные розетки соединены межрозеточной ДНК. Средняя общая длина петель на одну розетку, образуемую в хромосомах китайского хомячка, составляет 14 мкм, средняя длина межрозеточной ДНК — 4,2 мкм, и среднее число петель в одной розетке — около 20.

Каковы отношения между хромосомным скаффолдом в делящихся клетках и ядерным матриксом в интерфазных клетках?

В ряде случаев одни и те же фрагменты ДНК участвуют в связывании с белками скаффолда и матрикса. Ядерный матрикс и хромосомный скаффолд состоят из разных белков, хотя есть и общие. Например, топоизомераза II является основным компонентом хромосом-

Рисунок 11.12



Участок ядерной оболочки с порой и двумя ламинами

ного скаффолда и одновременно входит в ядерный матрикс.

Неожиданной чертой MAR является отсутствие в них консервативных последовательностей. Они обычно на 70 % состоят из нуклеотидов A, T, но не имеют каких-либо консенсусных последовательностей, исключая сайт распознавания топоизомеразой II.

Вопрос о соответствии петель хромомерам политенных хромосом также не решен. Длины ДНК, составляющей хромомер политенной хромосомы у дрозофилы, достаточно для формирования от 1 до 16 петель. В результате картирования сайтов связывания с белками скаффолда в пределах клонированной области 3R-хромосомы дрозофилы размером 320 тпн между SAR-сайтами выявлено пять фрагментов ДНК, размеры которых различны: 78, 43, 112, 26 и 62 тпн. Число генов, картированных в пределах каждой петли, варьирует от 1 до 8.

В 1980 г. Л. Джерас и Г. Блобел обнаружили, что непосредственно под ядерной мембраной располагается белковый слой, названный ламиной.

Ядерная ламина представляет собой белковый каркас толщиной 25–100 нм, состоящий из промежуточных филаментоподобных фибрилл, которые выстилают внутреннюю поверхность ядерной оболочки и таким образом ограничивают нуклеоплазму. Считается, что ядерная ламина выполняет функцию скелетной поддержки ядерной оболочки, обеспечивая тем самым целостность интерфазного ядра (рис. 11.12).

Масса хроматина, занимая бóльшую часть ядерного объема, соединяется с какими-то участками ядерной ламины. Во время митоза ядерная оболочка разрушается, превращаясь в маленькие пузырьки, а ламина диссоциирует на белковые субъединицы. В поздней телофазе ламина окружает деконденсирующийся хроматин, затем этот комплекс окружается мембранными пузырьками, из которых восстанавливается ядерная оболочка.

Основным компонентом ядерной ламины являются белки, называемые ламинами. Эти белки в некоторых случаях специфично связываются с хроматином, а также с последовательностями SAR и MAR.

Литература к разделу 11.2

Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989. С. 83–140.

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 231–245.

Ченцов Ю. С. Современные представления о строении митотических хромосом // Соросовский образовательный журн. 1996. Т. 8. С. 14–22.

Lewin B. Genes V. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 46–48, 776–778.

Nuclear matrix: structural and functional organization / R. Berezney, K. W. Jeon (ed.). San-Diego; London; Boston; New York: Academic Press, 1995. 471 p.

Razin S. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions // Intern. Rev. Cytol. 1995. Vol. 162B. P. 405–449.

11.3. ХРОМОМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ

В конце XIX в. ряд исследователей (E. Balbiani, W. Pfitzner, W. Flemming) [Вильсон, 1936] нашли, что хромосомная нить на стадии профазы митоза содержит небольшие сильно окрашивающиеся тельца, или хромомеры, различающиеся по размерам и форме. В профазе мейоза рисунок хромомеров в гомологичных хромосомах полностью симметричен (рис. 11.13).

«Каждое хроматиновое зернышко одной нити имеет двойника в другой, и нет хотя бы малейшей особенности одной нити, которая не повторялась бы в точности у ее спутника» [Вильсон, 1936. С. 799]. Различаясь между собой по величине, форме, содержанию ДНК и положению в хромосоме, хромомеры обладают отчетливо выраженной индивидуальностью и придают хромосомным нитям и отдельным их участкам постоянный и определенный рисунок, строго фиксированный наследственно.

Только в профазе митоза и мейоза (лептотена и пахитена) хромосомы имеют хромомерную организацию у всех эукариот, на других

Рисунок 11.13

[redacted]

Хромомерный рисунок одной из хромосом *Agapanthus umbellatus* в пахитене мейоза (*а*), средней профазе II (*б*) и средне-поздней профазе митоза (*в*) [Lima-de-Faria, 1954, 1975. — Из: Жимулёв, 1994. С. 13]

стадиях клеточного цикла хромомеры увидеть трудно. Идеи о том, что хромомеры (или гранулярность хромосомной нити) существуют и в интерфазных ядрах, в которых индивидуальные хромосомы не опознаются, развивал еще В. Флемминг в 1882 г.

Наиболее выраженные хромомеры встречаются в политенных хромосомах и хромосомах типа «ламповых щеток». Х. Бауэр (H. Bauer) в 1935 г. предположил, что диски политенных хромосом образуются за счет бокового слияния хромомеров в параллельно расположенных хроматидах (рис. 11.14).

У. Дюрие в 1941 г. описал хромомеры в хромосомах типа «ламповых щеток», которые находят в первичных ооцитах (профаза, по-видимому, диплотена) многих позвоночных и некоторых беспозвоночных (рис. 11.15).

От хромомеров отходят боковые петли, в результате чего хромосома выглядит как ершик для чистки керосиновых ламп, поэтому их и называют хромосомами типа «ламповых щеток» (lampbrush chromosomes). В целом у амфибий картины хромомеров в хромосомах этого типа от препарата к препарату одинаковы. Число хромомеров в кариотипах у разных видов саламандр варьирует в пределах 4–10 тыс.

В результате всех этих исследований в начале 70-х гг. сформировалось представление о едином типе организации хромосом — хромомерном. Однако современные данные о хромомере не свидетельствуют об универсальности этого понятия.

Рисунок 11.14

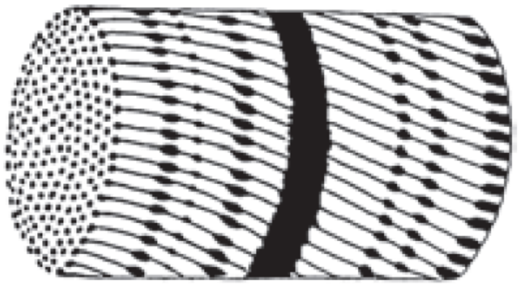


Схема образования поперечных дисков в политенных хромосомах [Гершензон, 1983. С. 93]

Два свойства являются общими для хромомеров различных типов: во-первых, все они представляют собой отрезки компактизованной ДНК, во-вторых, число и рисунок хромомеров у данного организма постоянны на данной стадии клеточного цикла.

Признаков, отличающих хромомеры разных типов друг от друга, значительно больше.

1. В то время как хромомеры мейотических хромосом находят в клетках зародышевого пути, хромомеры, например, политенных хромосом — в клетках соматических. В онтогенетическом смысле слюнные железы являются конечным этапом дифференцировки, в то время как мейотические клетки дают начало новым клеточным поколениям.

2. Число хромомеров существенно варьирует в разных типах тканей (см. рис. 11.13). Так, у *Agapanthus umbellatus* в пахитенных хромосомах находят 1600 хромомеров, а в профазе II мейоза — 239, у *Ornithogalum virens* в пахитене — 274, в профазе митоза в клетках пыльцы — 67. Такие различия в числе компактных участков хроматина связаны с тем, что хромосомы из клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, имеют разную степень компактизации. Если хромомеры, слагающие диски максимально декомпактизованных интерфазных политенных хромосом, представляют наиболее короткие фрагменты геномной ДНК, то хромомеры профазы мейоза или митоза формируются за счет большей компактизации материала, видимо, слияния интерфазных хромомеров и, соответственно, более высокого уровня укладки хроматина.

На более поздних стадиях клеточных делений происходит дальнейшее увеличение размеров хромомеров, укорочение межхромомерных промежутков, и в конечном счете весь материал объединяется в одну митотическую хромосому (рис. 11.16).

Рисунок 11.15

Хромомеры с отходящими от них петлями в биваленте хромосомы XII у тритона *Triturus cristatus karelinii* [Callan, 1963. — Из: Жимулёв, 1994. С. 12]

Рисунок 11.16

Изменение хромомерного рисунка в ядрышкообразующей хромосоме *Allium cepa* в профазе–метафазе мейоза [Элленгорн, 1937. — Из: Жимулёв, 1994. С. 14]:
а — ранняя профаза; *б* — укорочение профазных хромосом; *в* — дальнейшее укорочение межхромомерных участков; *г* — метафазная хромосома.
Положение ядрышкового организатора указано стрелкой

3. Соответственно изменению числа хромомеров изменяется и их генетическое содержание. Изучая мейоз у лилейных растений и ряд свойств хромомеров и генов, Дж. Беллинг в 1928 г. пришел к выводу, что именно хромомеры и являются генами. Основанием для такого заключения послужили похожие черты в поведении или организации тех и других. И гены, и хромомеры расположены в хромосомах в строгом линейном порядке. Те и другие сильно различаются между собой по размерам и конъюгируют по принципу гомологии. Эти сходства и дали основания Беллингу назвать генами именно хромомеры.

Хотя эта гипотеза имела явно положительный момент: делалась попытка найти соответствие между морфологической структурой хромосомы и информационной единицей (геном), все же она была оставлена.

Главной причиной было то, что генов должно быть значительно больше, чем найдено хромомеров. По рассуждению А. Лима-де-Фариа (A. Lima-de-Faria, 1975), у *Homo sapiens* общее число хромомеров в пахитенных хромосомах около 500. Если правильна гипотеза 1 ген — 1 хромомер, человек должен иметь около 500 структурных генов — число, которое большинством генетиков рассматривалось бы слишком низким; для примера — у бактерии *E. coli* около 5000 генов. Число генов у человека по разным оценкам колеблется в пределах от 50 тыс. до 100 тыс.

По мнению Х. Кэллана, хромомеры хромосом типа «ламповых щеток» не имеют ничего общего с «функциональными» единицами, а пассивно формируются транскрипционной активностью перемежающих их функциональных единиц.

Таким образом, суммируя изложенные данные, можно подчеркнуть, что хромомеры — это фрагменты хромосом, способные к локальной компактизации. Длина фрагмента ДНК, входящего в состав хромомера, различна на разных этапах процесса компактизации хромосом в ходе клеточного цикла. Поэтому есть все основания считать, что хромомер не является постоянной структурной единицей генома и для каждого этапа онтогенеза существуют свои наборы хромомеров. Поэтому все известные типы хромомеров можно разделить по крайней мере на четыре группы: 1) лептотенные, 2) пахитенные, 3) хромосом типа «ламповых щеток», 4) интерфазных политенных хромосом.

Очевидно, что функциональная организация и генетическое содержание хромомеров в этих типах хромосом будут разными.

Литература к разделу 11.3

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 11–15.

Прокофьева-Бельговская А. А., Богданов Ю. Ф. Организация хромосомы // Журн. Всесоюзн. хим. об-ва Д. И. Менделеева. 1963. Т. 8. С. 33–46.

Вильсон Э. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. М.; Л.: Биомедгиз, 1936. С. 799.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 93.

Глава 12
ХРОМОСОМЫ ТИПА «ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК»

Хромосомы типа «ламповых щеток» формируются в ходе исключительно длительного мейотического деления, которое может продолжаться до нескольких месяцев. В течение этого времени хромосомы пребывают в сильно декомпактизованном состоянии и их можно наблюдать в световой микроскоп. На более поздних стадиях мейоза хромосомы становятся компактными. Длина отдельных хромосом типа «ламповых щеток» у тритона *Notophthalmus viridescens* варьирует от 400 до 800 мкм. Общая длина набора хромосом «ламповых щеток» составляет 5–6 мм.

Хромосомы этого типа были открыты в 1878 г. В. Флеммингом (W. Flemming). Флемминг и его студент Вибэ (Wiebe) в ходе исследований развития ооцитов у амфибий и рыб нашли «странные тонкие структуры» в окрашенных срезах ядер ооцитов аксолотля *Siredon pisciformis* (*Ambystoma mexicanum*), находящихся на ранних стадиях развития. Рисунок этих хромосом был опубликован в 1882 г. На нем были изображены ядра, содержащие толстые осевые тяжи, от которых отходили тонкие радиальные нити.

У. Дюрие в 1941 г. показал, что эта хромосома состоит из длинной нити, на которой рас-

Рисунок 12.1

Хэролд Кэллан
(1917–1993)

Рисунок 12.2

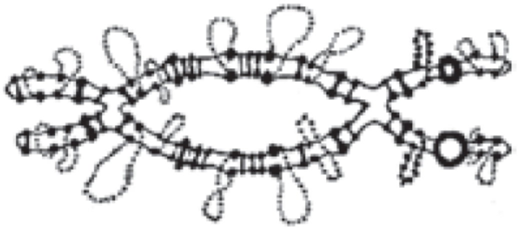
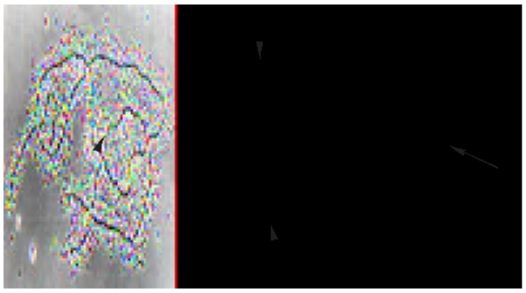


Схема строения бивалента типа «ламповых щеток», представленная Дюрие в 1941 г. [Callan, 1986. P. 12]

Рисунок 12.3



Фазово-контрастная фотография свежеизолированных и нефиксированных хромосом у *Notophthalmus viridescens* [Gall, 1966. — Из: Callan, 1986. P. 29].
На рисунке представлен один бивалент.
Стрелка указывает на слившийся район центромер.
Три треугольника указывают на хиазмы

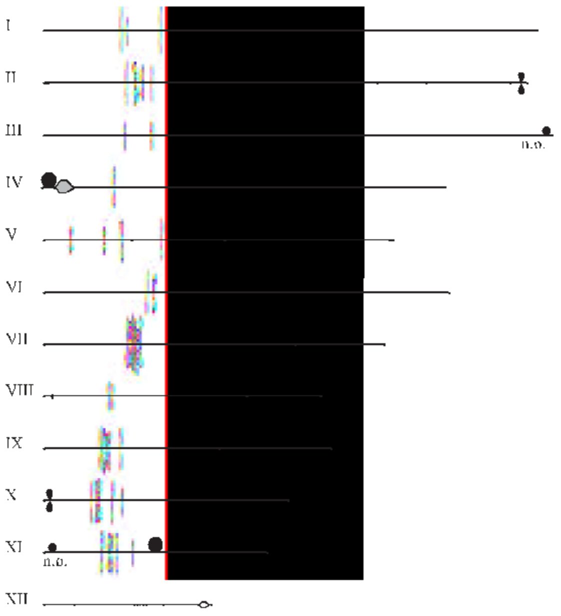
полагаются гранулы — хромомеры размером 1–2 мкм. Хромомеры присутствуют парами, от них отходят петли (рис. 12.2).

В наше время успехи в исследованиях хромосом этого типа связаны в основном с именами Дж. Голла (см. рис. 9.17) и Х. Кэллана (рис. 12.1).

В исследованиях Дж. Голла, результаты которых были опубликованы в 1954 г., показано, что хромомеры, имеющие различные размеры, регулярно опознаваемы в одних и тех же положениях в хромосоме от препарата к препарату. Именно хромомеры и нити между ними, как оказалось, содержат ДНК, и наиболее крупные хромомеры и выходящие из них петли имеют индивидуальность, т. е. свои размеры и морфологию. Такие хромомеры, как правило, редки, и в хромосомах типа «ламповых щеток» представлены в основном рядовые петли (рис. 12.3).

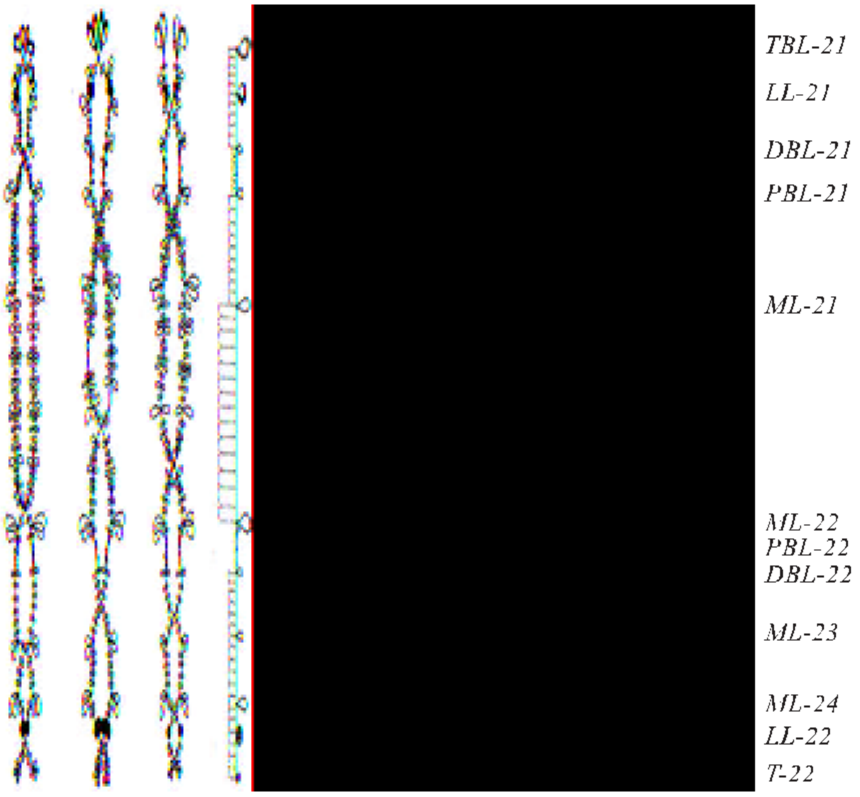
Наличие петель с сильно различающейся морфологией создает маркеры определенных участков хромосомы, благодаря чему как хромосома в целом, так и отдельный ее участок легко идентифицируются. Эти маркеры используют при построении карт хромосом данного типа (рис. 12.4 и 12.5).

Рисунок 12.4



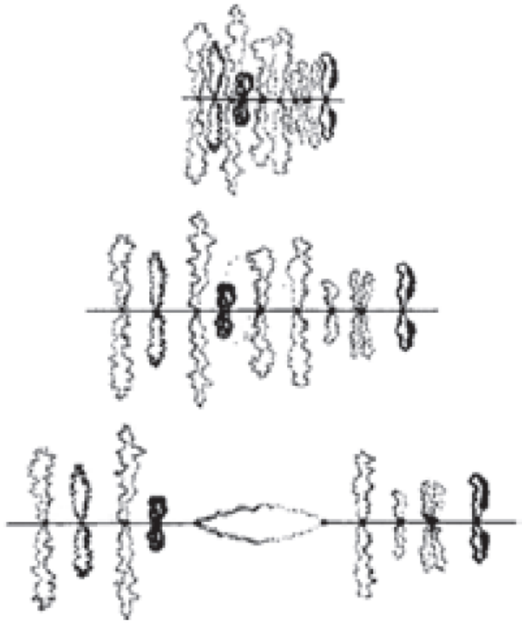
Карта набора хромосом I–XII типа «ламповых щеток» у *Pleurodeles waltii* [Lacroix, 1968. — Из: Callan, 1986. P. 72]. n.o. — ядрышковый организатор

Рисунок 12.5



Картирование петель в хромосомах типа «ламповых щеток» у курицы [Челышева и др., 1990]

Рисунок 12.6



Изменение структуры участка хромосомы типа «ламповой щетки» при растяжении его с помощью микроманипулятора [Callan, 1963. — Из: Callan, 1986. P. 18]

Каждая из хромосом типа «ламповых щеток» состоит из двух хроматид. Это становится очевидным при механическом растяжении хромосомы с помощью микроманипулятора (рис. 12.6). На рисунке видно, как материал петли выходит из одного хромомера и входит в соседний, а затем эти хромомеры сливаются в один в нерастянутой хромосоме. Таким образом, петля является межхромомерным промежутком хромосомы.

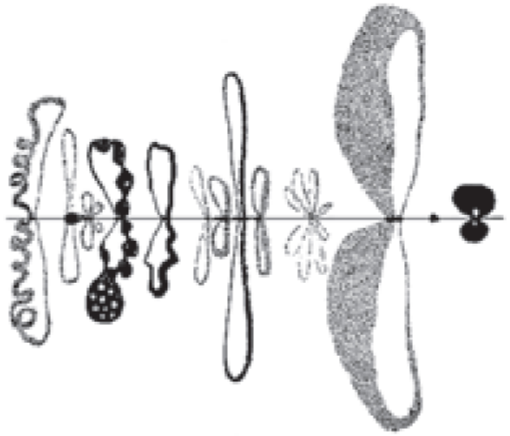
Две петли, выходящие из одной и той же пары хромомеров, являются по сути двумя хроматидами.

Каждая петля устроена довольно сложно: она имеет нитевидную сердцевину, окруженную накопленными в данном районе продуктами активности. От начала до конца петли накопление продуктов происходит асимметрично. На одном конце их почти нет, на другом — максимальное количество. По характеру накопления материала петли могут сильно различаться (рис. 12.7).

Рисунок 12.8

Организация хромомеров и их предполагаемая связь с парой латеральных петель [Gall, 1956. — Из: Callan, 1986. P. 21]

Рисунок 12.7



Некоторые характерные типы петель и связанных с ними хромомеров в хромосомах типа «ламповых щеток» у тритона [Callan, 1955. — Из: Callan, 1986. P. 20]

В 1956 г. Дж. Голл предложил схему организации хроматиды в участках хромомеров и в петлях. По этой схеме хромомер состоит из компактизованной ДНК, из которой выходит декомпактизованная петля. Распределение «матрикса» на петле соответствует продвижению транскрипции: тонкая часть петли — это начало транскрибируемого района, толстая — наиболее удаленная от участка инициации часть (рис. 12.8).

Включение ^{3}H-уридина в участки петель впервые было показано Голлом и Кэлланом в 1962 г. Как правило, предшественник равномерно метит всю петлю. Однако некоторые петли не метились, другие метились только в одной части.

Найдено несколько типов распределения участков транскрипции в петле (рис. 12.9).

Рисунок 12.9

Разные типы организации транскрипции в петлях хромосом типа «ламповых щеток» [Scheer et al., 1976. — Из: Callan, 1986. P. 117]

Классический тип — когда матрикс располагается по длине всей петли. При этом ясно различаются толстый и тонкий концы петли, толщина матрикса постепенно нарастает от тонкого конца к толстому и, достигнув максимума, более не увеличивается.

Производным этого типа организации является следующий: транскрипционная единица в петле расположена также полярно, однако в ее начале и конце имеются нетранскрибируемые участки. Есть петли, которые включают две или более транскрипционные единицы противоположной полярности, расположенные либо «голова к голове» (под головой понимается точка начала транскрипции), либо «хвост к хвосту» (хвост — участок терминации транскрипции) (см. рис. 12.9).

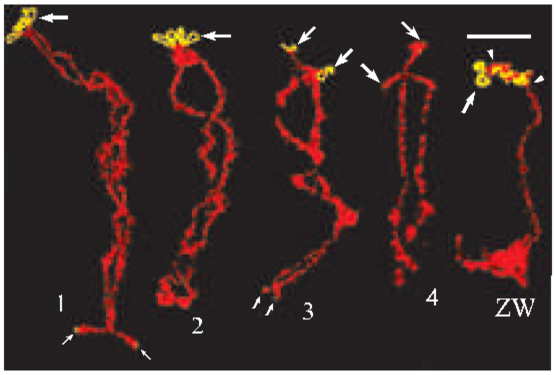
По результатам гибридизации *in situ* различных последовательностей ДНК показано, что некоторые гены полностью занимают участки транскрипционной активности в петлях. Например, ДНК гистоновых генов локализуется в 8 петлях *Triturus c. carnifex*.

В петлях транскрибируются сателлитные ДНК. Сателлитная ДНК, называемая у *N. viridenscens* сателлитом I и состоящая из повторенных фрагментов длиной 222 пн, гибридизуется с гигантской петлей, имеющей единственную транскрипционную единицу. Интересно, что гибридизация выявляется, если препарат предварительно не обрабатывали РНК-азой и ДНК на нем не денатурировали. Это свидетельствует о том, что данная сателлитная ДНК транскрибируется в хромосомах типа «ламповых щеток». Сателлит TcS2 состоит из 330 пн. Он транскрибируется во многих петлях в ооците. Транскрипты затем находят в цитоплазме ооцита.

Хромосомы типа «ламповых щеток» удобны для картирования в них молекулярных и генетических маркеров. На рис. 12.10 показаны хромосомы курицы после гибридизации *in situ* ДНК одного из прителомерных повторов.

Возможности использования хромосом типа «ламповых щеток» значительно увеличились в результате удивительного открытия, сделанного в 1998 г. Дж. Голлом и К. Морфи. Они обнаружили, что «ламповые щетки» можно индуцировать искусственно, если, например, инъецировать головку спермия в ооцит, где находятся уже существующие хромосомы этого типа. Из ДНК спермия формируются хромосомы типа «ламповых щеток». Число их соответствует числу хромосом гаплоидного набора вида. Сначала этот феномен был обнаружен на ксенопусе. Затем оказалось, что возможны гетерологичные превращения. «Ламповые щетки» формировались из головок спермиев леопардовой лягушки или рыбки данио рерио (zebrafish) в результате инъекций спермиев в ооцит ксенопуса. Авторы полагают, что такие хромосомы можно будет получить после инъекций спермиев млекопитающих, и в первую очередь человека, что позволит картировать хромосомы с высоким уровнем разрешения.

Рисунок 12.10



Локализация фрагмента ДНК (окрашен желтым и указан стрелками) на теломерных участках хромосом типа «ламповых щеток» у курицы [Hori et al., 1996].
Биваленты 1–4 и половые хромосомы ZW. Шкала — 25 мкм

Литература

Челышева Л. А., Соловей И. В., Родионов А. В., Яковлев А. Ф., Гагинская Е. Р. Хромосомы — ламповые щетки курицы. Цитологические карты макробивалентов // Цитология. 1990. Т. 32. С. 303–316.

Callan H. G. Lampbrush chromosomes. Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag, 1986. 254 p.

Gall J. G., Murphy C. Assembly of lampbrush chromosomes from sperm chromatin // Molec. Biol. Cell. 1998. Vol. 9. P. 737–747.

Hori T., Suzuki Y., Solovei I. Characterization of DNA sequences constituting terminal heterochromatin of the chicken Z chromosome // Chromos. Research. 1996. Vol. 4. P. 411–426.

Глава 13
ПОЛИТЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ

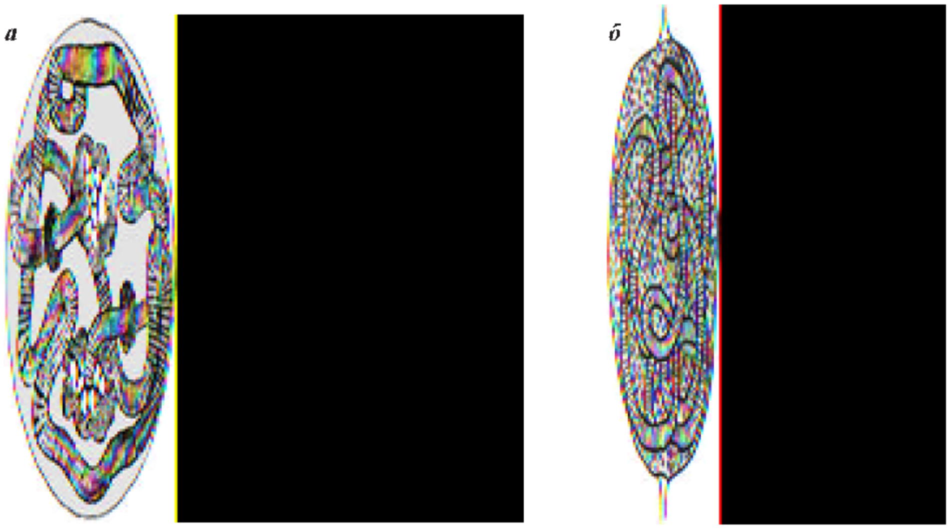
13.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Политенные хромосомы были открыты Э. Бальбиани (E. Balbiani) в 1881 г. в клетках слюнных желез, мальпигиевых сосудов, кишечника, гиподермы и мышц личинок *Chironomus plumosus*. Они были описаны как длинные цилиндрические шнуры, которые, многократно изгибаясь, заполняют весь объем ядра. Шнуры эти были названы «перманентной спиремой», поскольку, по мнению автора, в каждом ядре был только один такой шнур и он напоминал слегка закрученную спиральную нить — спирему. Девять лет спустя, в 1890 г., Э. Бальбиани открыл «перманентную спирему» в развивающемся зачатке макронуклеуса инфузории *Loxophyllum meleagris* (рис. 13.1).

В 1933–1934 гг. три группы исследователей: Т. Пайнтер (T. Painter), Э. Хайц и Х. Бауэр (E. Heitz, H. Bauer), Р. Кинг и Х. Бимс (R. King, H. Beams), используя метод давленых препаратов, показали, что «спирема» не является сплошным одиночным шнуром, а состоит из отдельных элементов, число которых было близким к гаплоидному числу митотических хромосом. По мнению этих исследователей, каждый элемент «спиремы» есть результат плотного синапсиса гомологичных хромосом.

В 1912 г. чешский ученый Ф. Рамбоусек (F. Rambousek) впервые предположил, что спирема имеет непосредственное отношение к хромосомам. Затем это сделали Д. Костов в 1930 г., Н. К. Кольцов в 1934 и Х. Бауэр в 1935 г. Важнейшие доказательства в пользу хромосомной природы спиремы получил Т. Пайнтер в середине 30-х гг. Используя серию хромосомных перестроек с точками разрывов в известных районах хромосом, он прокартировал 22 гена и продемонстрировал полное линейное соответствие между их расположением на генетической карте, а также на цитологических картах митотических хромосом и спиремы. Гигантские

Рисунок 13.1



Первые рисунки политенных хромосом, сделанные Э. Бальбиани в 1881 (*а*) и 1890 (*б*) гг. [Жимулёв, 1992. С. 14, 83]:

а — ядро клетки слюнной железы личинки *Chironomus plumosus*;
б — зачаток, по-видимому, макронуклеуса инфузории *Loxophyllum meleagris*

размеры хромосом слюнных желез, согласно гипотезе Н. К. Кольцова, объяснялись их многонитчатостью. Термин «политенные хромосомы» был предложен П. Коллером (P. Koller) в 1935 г. и был принят по рекомендации С. Дарлингтона (C. Darlington) в 1937 г.

Итак, можно выделить следующие особенности политенных хромосом:

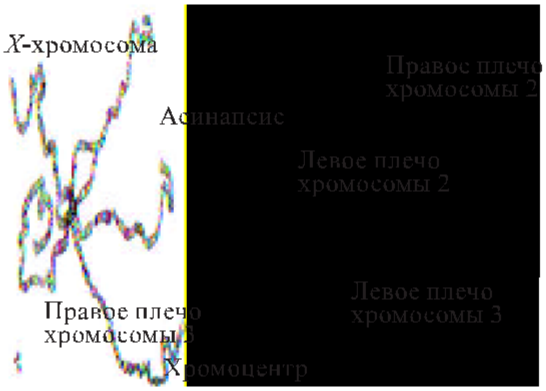
1) это интерфазные хромосомы, максимально декомпактизованные и находящиеся в состоянии, когда гены имеют максимальные возможности для экспрессии, т. е. активно функционирующие хромосомы;

2) они имеют гигантские размеры, так как состоят из тысяч гомологичных нитей — хроматид;

3) эти хромосомы имеют характерный рисунок поперечной исчерченности — рисунок хромомеров (рис. 13.2);

4) число хромосомных элементов в ядрах с политенными хромосомами чаще всего гаплоидное, так как гомологичные хромосомы каждой пары тесно конъюгируют друг с другом, в результате чего общее число хромосом уменьшается вдвое.

Рисунок 13.2



Политенные хромосомы *Drosophila melanogaster* [Painter, 1934].

Хромосомы расправились на предметном стекле в результате раздавливания. Каждая родительская хромосома спарена со своим гомологом (соматический синапсис). Есть районы, где две хромосомы лежат раздельно (асинапсис). Все хромосомы связаны центромерными районами в общий хромоцентр. В левом нижнем углу показаны митотические хромосомы из клеток яичников при том же увеличении

Литература к разделу 13.1

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 12–29.

Кикнадзе И. И. Функциональная организация хромосом. Л.: Наука, 1972. 209 с.

Медведев Ж. А. Молекулярно-генетические механизмы развития. М.: Медицина, 1968. С. 107–127.

Ashburner M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development // Advances in Insect Physiology. 1970. Vol. 7. P. 1–95.

Ashburner M., Berendes H. D. Puffing of polytene chromosomes // The Genetics and Biology of Drosophila / M. Ashburner, T. R. F. Wright (ed.). London; New York; San Francisco: Academic Press, 1978. Vol. 2b. P. 316–395.

Beermann W. Riesenchromosomen // Protoplasmatologiya. Wien: Springer Verlag, 1962. 6D. S. 1–161.

Berendes H. D. Synthetic activity of polytene chromosomes // Int. Rev. Cytol. 1973. Vol. 35. P. 61–116.

Sorsa V. Polytene chromosomes in genetic research. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1988. 289 p.

Zhimulev I. F. Morphology and structure of polytene chromosomes // Advances in Genetics. 1996. Vol. 34. P. 1–497.

Zhimulev I. F., Belyaeva E. S., Semeshin V. F. Informational content of polytene chromosome bands and puffs // CRC Critical Reviews in Biochemistry. 1981. Vol. 11. P. 303–340.

13.2. МОРФОЛОГИЯ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

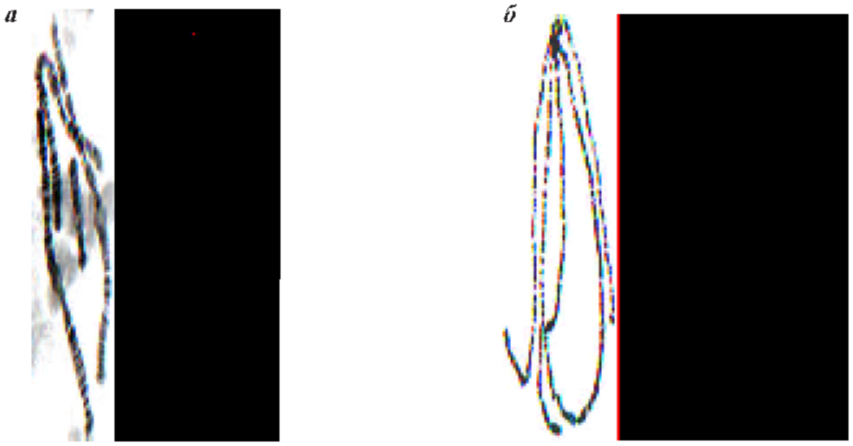
Политенные хромосомы изучают на давленых препаратах: слюнные железы (чаще всего) или другие органы фиксируют в кислых фиксаторах, красят в кислотном растворе орсеина или кармина и затем раздавливают между предметным и покровным стеклами. Хромосомы при этом расправляются.

Выделяют два типа расположения хромосом в ядре: независимое друг от друга и связанное — с объединением прицентромерных районов всех хромосом в общий хромоцентр (рис. 13.3).

Какой-либо эволюционной связи между видовой принадлежностью и наличием или отсутствием хромоцентра не обнаружено.

Морфология политенных хромосом может широко варьировать в зависимости от степени синапсиса хроматид. Политенные хромосомы развиваются из хромосом диплоидных ядер за счет последовательных дупликаций каждого хромосомного элемента. Если конъюгация гомологичных хроматид максимальна, образуются «классические» политенные хромосомы, т. е. цилиндрические жгуты с отчетливым ри-

Рисунок 13.3



Хромосомы *Chironomus tentans* без хромоцентра (*а*) и *Drosophila virilis* с хромоцентром (*б*) [Beermann, 1962; Губенко, 1983. — Из: Жимулёв, 1992. С. 131]

сунком дисков: такие, какие были описаны у *Chironomus tentans* или *Drosophila melanogaster* (см. рис. 13.3; 13.4, *а*). Если степень конъюгации хроматид минимальна, образуется полиплоидное ядро с ретикулярной структурой. Это так называемая скрытая политения (см. рис. 13.4, *б*). В ряде случаев конъюгация хроматид нарушается очень сильно, но только в некоторых хромосомах из всего набора. Эти хромосомы не имеют рисунка дисков, становятся диффузными, похожими на помпоны (*в*).

Существует обширная литература о возможности переходов из одной формы политении в другую. Рассмотрим некоторые примеры.

1. В питающих клетках ооцитов взрослых мух — представителей большинства семейств отряда Diptera — классические политенные хромосомы не образуются. Однако у некоторых видов, например у комаров рода *Anopheles*, политенные хромосомы имеют наиболее четкий рисунок дисков именно в питающих клетках. У дрозофил классические политенные хромосомы в питающих клетках образуются только у мутантов, при этом четкость рисунка дисков увеличивается при понижении температуры и введении в геном дополнительного гетерохроматина (*Y*-хромосомы). Классические политенные хромосомы в питающих клетках ооцитов *D. melanogaster* формируются у мутантов *otu* (*ovarian tumor*) и *fs(2)B*. И совсем поразительные данные были получены в результате генетических экспериментов на мясной мухе *Calliphora erythrocephala*. После 14 поколений тесного инбридинга (см. разд. 19.1) с отбором на улучшение «качества» хромосом были получены две сублинии с четким рисунком дисков. У гибридов от скрещивания этих линий между собой классические политенные хромосомы не формируются (рис. 13.5), поскольку хроматиды полностью теряют конъюгационные способности. Этот переход от скрытой политении к классической и обратно связан с тем, что аллели, контролирующие конъюгацию хроматид и являющиеся, по-видимому, рецессивными, в результате инбридинга переходят в гомозиготное состояние. Генов, вероятно, несколько, и гомозиготности по рецессивному аллелю любого из них достаточно, чтобы получить политенные хромосомы классической формы. После инбридинга образовались две линии, в каждой из которых гомозиготными стали разные гены. Скрещивание линий между собой переводит эти гены в гетерозиготное состояние, и классические политенные хромосомы исчезают.

2. Помпоноподобные *X*-хромосомы у дрозофилы образуются в результате мутаций, т. е. при нормальной конъюгации хроматид формируется классическая политенная хромосома, а у мутантов — «помпон». Многочисленные случаи переходов от классических хромосом к помпоноподобным известны у многих видов как результат различных физиологических нарушений, например мутаций, инкубации органов, содержащих политенные хромосомы, *in vitro* или *in vivo*, инфекций.

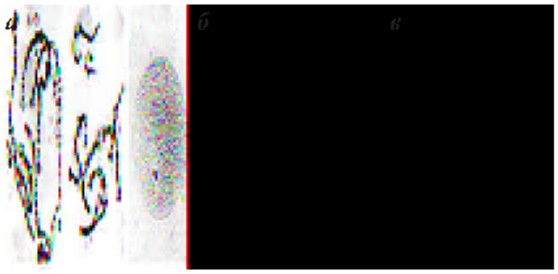
3. У родственных видов ногохвосток (отряд Collembola) обнаружено варьирование структуры политенных хромосом: у одного вида, *Pseudachorutes palmiensis*, все ядро заполнено помпоноподобными хромосомами, у которых конъюгация хроматид сохраняется лишь в области блоков прицентромерного гетерохроматина. У другого вида, *Protachorutes*, конъюгацию

Рисунок 13.4

Степень конъюгации и расположение хроматид в политенных хромосомах классического типа (*а*), при скрытой политении (*б*) и в помпоноподобных хромосомах (*в*).

Индивидуальные хроматиды с хромомерами, обозначенными черными прямоугольниками, плотно контактируют друг с другом, при этом хромомеры формируют диски (*а*). Хроматиды контактируют друг с другом только в некоторых участках, формируя структуру наподобие метлы (*б*). Конъюгация хроматид нарушена полностью, формируется «помпон» (*в*). Кружком помечен центромерный район

Рисунок 13.5



Возникновение ретикулярной структуры (*в*) в ядрах питающих клеток ооцитов у *Calliphora erythrocephala* в результате скрещивания двух инбредных (*а*, *б*) линий с классическими политенными хромосомами [Ribbert, 1979. — Из: Жимулёв, 1992. С. 62]

сохраняют хроматиды в прицентромерных и проксимальных частях хромосом, более удаленные участки хроматид расконъюгированы.

4. Особенно интересным является то, что степень конъюгации хроматид зависит от температуры.

С середины 30-х гг. известно, что более четкая картина дисков получается, если все процедуры (выращивание личинок для опыта, приготовление препаратов хромосом) проводятся при низких температурах. Еще более сильное влияние температуры на морфологию политенных хромосом было обнаружено в опытах с фасолью. У растений давно известны политенные хромосомы, образующиеся в различных типах клеток, однако эти хромосомы не имеют рисунка дисков (скрытая политения). Такой тип хромосом возникает, если выращивать растения при температуре 22 °C. Если изменить температурный режим (8 °C ночью и 12 °C — днем), политенные хромосомы приобретают четкий рисунок дисков.

В общем морфология политенных хромосом самок и самцов у насекомых одинакова. Однако у самцов дрозофилы *X*-хромосома имеет отличия: она более разрыхлена, слабее окрашивается, и толщина ее почти такая же, как у двух *X*-хромосом самок. Количество негистоновых белков в *X*-хромосоме самца примерно в полтора раза выше, чем в одной хромосоме самки. *X*-хромосома самца синтезирует вдвое больше РНК, чем *X*-хромосома самки. Это явление называется дозовой компенсацией (см. подробнее в разд. 14.7.1). Гены *Sxl*, *mle* и *msl* играют главную роль в создании особой морфологии *X*-хромосомы самца. Белки, кодируемые генами группы *msl*, в сочетании с особой ацетилированной формой гистона H4 разрыхляют *X*-хромосому самца.

Литература к разделу 13.2

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 126–154.

13.3. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ В ПРИРОДЕ

С учетом данных о классической и скрытой политении ниже приведены сведения о распространении политенных хромосом в природе (табл. 13.1).

Литература к разделу 13.3

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 30–125.

Таблица 13.1. Встречаемость политенных хромосом в природе

Организмы	Орган	Тип политении	
		классическая	скрытая
Ранний эмбрион			У мутанта *gnu D. melanogaster*
Насекомые отряда Diptera	Личинки: слюнные железы, кишечник, желудок, мальпигиевы сосуды, жировые тела, ядовитая железа, анальные папиллы	В нормальном развитии	
	Куколки: мальпигиевы сосуды, жировые тела, прямая кишка, пулвиллы, трихогенные клетки	В нормальном развитии	
	Имаго: мальпигиевы сосуды, задняя кишка	В нормальном развитии	
	Имаго: питающие клетки ооцитов	У комаров *Anopheles*	У большинства двукрылых
		У *Calliphora* после инбридинга	
		У мутантов *otu D. melanogaster*	
Насекомые отряда Orthoptera	Эноциты		Возможно, в нормальном развитии
Насекомые отряда Lepidoptera	Шелкоотделительная железа		То же
Насекомые отряда Collembola	Слюнная железа	В нормальном развитии	
Инфузории	Зачаток макронуклеуса	В нормальном развитии	
Аскариды	Пищеварительная железа		Возможно, в нормальном развитии
	Эпителий матки		То же
Моллюски	Гигантский нейрон		— " —
Млекопитающие	Клетки трофобласта		В нормальном развитии
	Любые клетки		Возможна при малигнизации
Растения	Антиподы, синергиды, эндосперм, гаусторий	При низкой температуре	В нормальном развитии

13.4. МНОГОНИТЧАТОСТЬ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

Предположение о многонитчатости только что переоткрытых гигантских хромосом, высказанное Н. К. Кольцовым в 1934 г., вскоре получило многочисленные экспериментальные подтверждения. К настоящему времени имеются разнообразные доказательства того, что хромосомы этого типа являются пучком индивидуальных нитей — хроматид.

Самое простое доказательство политенности хромосом дает, по-видимому, измерение количества ДНК в ядрах с политенными хромосомами и отнесение этого количества к содержанию ДНК в обычном диплоидном или гаплоидном ядре. Это отношение будет характеризовать степень плоидности (политенности) хромосом в данном типе клеток на данной стадии развития. Для этого чаще всего используют методики цитофотометрии или спектрофотометрии, основанные на измерении поглощения света определенной длины волны при прохож-

Таблица 13.2. Степень политении в клетках некоторых типов [Жимулёв, 1992. С. 175–178]

Виды	Органы	Степень политении (*n*)
Chironomus plumosus	Слюнные железы личинок	1 024–4 096
Ch. tentans	Слюнные железы личинок	8 192–32 768
Drosophila melanogaster	Слюнные железы личинок	1 024–2 048
	Средняя кишка личинок	512–1 024
	Мальпигиевы сосуды имаго	2–256
	Жировые тела личинок	16–512
	Проторакальная железа личинок	64–512
	Питающие клетки ооцитов имаго	512–8 192
Rhynchosciara angelae	Слюнные железы личинок	4 000–16 000
	Слюнные железы личинок после внутриклеточной инфекции микроспоридиями	512 000–1 024 000
Млекопитающие	Трофобласт	64–4 096
Растения	Суспензор, гаусторий, антиподы и синергиды	2–8 192

дении через окрашенный или неокрашенный препарат.

Степень политении существенно различается как в разных клетках одного органа, так и в клетках разных органов (табл. 13.2).

Удивительно высокая степень политении была обнаружена в клетках двукрылых насекомых, подвергнувшихся внутриклеточной инфекции. Число хроматид в таких супергигантских политенных хромосомах достигает миллиона, и они становятся видимыми невооруженным глазом.

Литература к разделу 13.4

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 170–182.

13.5. СИНАПСИС И АСИНАПСИС ГОМОЛОГОВ

Явление соматического синапсиса состоит в том, что гомологичные хромосомы каждой пары объединяются. Оба элемента конъюгируют диск к диску максимально точно, так что создается впечатление единой хромосомы. В результате этого число политенных хромосом в ядре уменьшается до гаплоидного.

Соматический синапсис не является обязательной характеристикой политенных хромосом. Если у двукрылых насекомых гомологичные хромосомы всегда в той или иной степени конъюгируют, то для растений или первичнобескрылых насекомых в норме характерно отсутствие синапсиса. Не совсем ясно, синаптируют ли политенные гомологи у инфузорий и млекопитающих, так как имеющиеся данные противоречивы.

Синапсис может быть на том или ином протяжении нарушен (около 20 % ядер клеток в слюнных железах у разных видов двукрылых). Особо интересен открытый уже в первой статье Э. Бальбиани (см. рис. 13.1), а затем переоткрытый Х. Бауэром в 1936 г. факт специфического асинапсиса: у *Chironomus plumosus* четвертые хромосомы не конъюгируют и располагаются в ядре раздельно. В этом случае в одном и том же ядре три пары хромосом конъюгируют, одна — нет, что может свидетельствовать о существовании по крайней мере двух разных механизмов конъюгации.

Интересно проявляется нарушение конъюгации у некоторых межвидовых гибридов. Давно было замечено, что у гибридов разных видов дрозофил уровень асинапсиса гомеологов выше, чем у родительских видов, участвовавших в скрещиваниях. Удивительным был обнаруженный Ф. Г. Добржанским в 1957 г. факт полного отсутствия конъюгации у гибридов *D. insularis* × *D. tropicalis*. У потомков гомеологи конъюгируют только в области хромоцентра. При этом рисунок дисков в политенных хромосомах идентичен.

Участки, в которых состояние асинапсиса переходит в состояние синапсиса, не случайны. Обычно это районы интеркалярного гетерохроматина.

Частота асинапсиса может значительно изменяться под действием различных факторов,

являющихся модификаторами эффекта положения, таких как варьирование температурой и количеством гетерохроматина в ядре (число *Y*-хромосом).

Литература к разделу 13.5

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 154–169.

13.6. ХРОМОМЕРНЫЙ РИСУНОК В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ

Политенные хромосомы классического типа имеют характернейшую особенность — поперечную исчерченность. Вдоль каждой отдельно взятой хроматиды расположены, чередуясь, участки более (хромомеры) или менее (межхромомеры) плотной упаковки ДНП. Когда многочисленные сестринские хроматиды тесно конъюгируют, гомологичные хромомеры, сближаясь, образуют поперечную полосу — диск (см. рис. 11.14). Деконденсированные участки хроматид между хромомерами в политенной хромосоме образуют междиски.

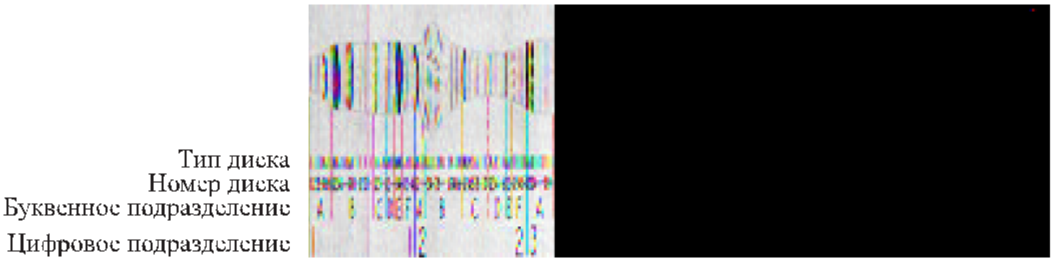
Одновременно с открытием политенных хромосом обнаружили и такое фундаментальное их свойство, как уникальность рисунка дисков. Было замечено, что в случае локального асинапсиса гомологов образец поперечной исчерченности, т. е. порядок дисков разной толщины, был одинаковым на обоих гомологах.

Размеры и морфология дисков, расстояния между соседними дисками строго индивидуальны для каждого, даже небольшого фрагмента хромосомы. В результате отдельные группы дисков могут служить маркерами не только районов, но и целых хромосом, например, у дрозофилы сдвоенные крупные пуфы, названные «китайскими фонарями» (Chinese lanterns), группа из четырех близко расположенных черных дисков — «четыре брата», длинный участок очень малого диаметра — «гусиная шея» и т. д. Все эти названия были даны К. Бриджесом еще в 1935 г. Неудивительно, что, если тот или иной фрагмент хромосомы перенесен перестройкой в новое положение, точки разрывов хромосом могут быть точно определены, а перенесенный сегмент — идентифицирован в новом положении. Все это позволяет строить цитологические карты, очень удобные тем, что по отношению к каждому диску можно определить положение того или иного гена, точек разрывов хромосомной перестройки, участка ДНК методом гибридизации *in situ*, различных белковых компонентов хромосом по локализации антител.

Построение цитологических карт обычно включает два этапа: 1) выявление, зарисовка или фотографирование дисков и особенностей морфологии хромосом, 2) нанесение наименований дисков на изображение хромосомы. Что касается собственно изображения хромосом, то в ходу у цитогенетиков долгое время были исключительно рисованные карты, позднее появились фотографические.

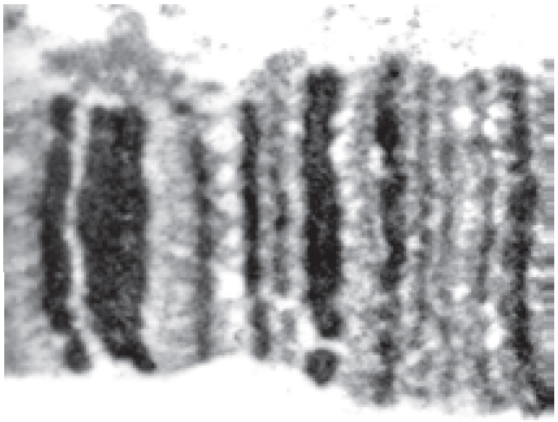
К. Бриджес предложил принцип обозначения дисков на картах, который с некоторыми вариациями использовался всеми последующими исследователями: каждое из пяти длинных плеч хромосом дрозофилы он поделил на 20 примерно равных по длине сегментов, начинающихся с крупного, хорошо заметного диска. Четвертая хромосома (микрохромосома) поделена на два таких сегмента. В итоге получается 102 района, обозначенных цифрами (рис. 13.6). Это цифровые подразделения карты, каждое из которых поделено еще на 6 участков, обозначенных буквами (A–F) и содержащих по нескольку дисков. Внутри буквенных подразделений каждый диск вновь обозначен цифрами. Таким образом, положение любого диска можно совершенно точно описать, на-

Рисунок 13.6



Фрагмент карты политенной *X*-хромосомы дрозофилы, нарисованной К. Бриджесом в 1938 г.

Рисунок 13.7



Электронно-микроскопическая фотография части 3R-хромосомы *Drosophila melanogaster*.
Диски и междиски выглядят как темные и светлые поперечные полосы.
Фотография любезно предоставлена В. Ф. Семешиным

Рисунок 13.8

Вольфганг Беерман (1921–2000)

пример, диск 2C1-2 — это первый «дублет» в подразделении C второго района *X*-хромосомы.

При раздавливании ядер с политенными хромосомами в жидкостях, содержащих уксусную, молочную или пропионовую кислоту, хромосомы легко расправляются и диски выглядят как хорошо известные сплошные поперечные полосы.

Морфология дисков при фиксации хромосом в спирт-уксусных смесях может варьировать, по словам Бриджеса, от едва заметных тонких, почти гладких линий до плотных широких полос, от тонких точек, формирующих поперечную полосу, до крупных точек, создающих диски, напоминающие ячеистые цепи, от тонких пунктиров до толстых дисков.

В 1930–1940 гг., когда были построены карты политенных хромосом *Drosophila melanogaster*, препараты готовили путем простого раздавливания в красителе, разведенном на 45%-й уксусной кислоте. По-видимому, именно поэтому (т. е. из-за большого содержания воды) большинство крупных дисков, которые выглядят сплошными на прижизненных фотографиях, теряют гомогенность в распределении материала, который скапливается по краям диска, образуя пузырь или капсулу, полые внутри. Если каждую стенку капсулы считать отдельным диском, то на месте каждого из них, одиночного до фиксации, можно нарисовать два — «дублет» по Бриджесу. На рис. 13.6 «дублеты» помечены галочками и имеют двойное обозначение (две цифры через дефис, например диск 2B1-2). Общепринято, что дублеты являются артефактами фиксации (на электронно-микроскопической фотографии, представленной на рис. 13.7, никакой двойственности дисков не видно), однако общий рисунок карт был сделан настолько хорошо и так много генов и хромосомных перестроек уже были картированы именно в «дублетах», что все генетики до сих пор пользуются только обозначениями Бриджеса. Всего на картах Бриджеса изображено чуть более 5000 дисков, однако, если считать, что около 1,5 тыс. из них изображены дублетами, общее число дисков должно быть уменьшено примерно до 3,5 тыс.

Рисунок дисков и междисков каждой политенной хромосомы является видоспецифичным и характерен для каждой хромосомы в различных тканях или на разных стадиях развития.

Тщательный анализ рисунка дисков в четырех органах *Chironomus tentans* привел В. Беермана (рис. 13.8) в 1950–1970 гг. к заключению, что данный рисунок дисков в значительной степени одинаков. Он выделил 4 типа различий:

1. «Присутствие — отсутствие». В одной ткани диск хорошо виден, в другой — нет.
2. «Одиночный — дублетный». Имеются два диска в одной ткани и только один диск — в другой.
3. «Разное расстояние». Расстояния между отдельными гомологичными дисками в хромо-

сомах разных тканей различны (удлинения — укорочения междисков).

4. «Тканеспецифичное усиление окраски междисков», соединяющих два или более близлежащих толстых диска.

Данные В. Беермана показали, что, наряду со значительной стабильностью и повторяемостью рисунка дисков в разных тканях, существует и некоторая вариабельность.

В настоящее время получены и многочисленные данные о существенных различиях в рисунке дисков в клетках нормально функционирующих органов. Так, при сравнении рисунка дисков в трихогенных клетках и питающих клетках ооцитов не было найдено хоть какой-то гомологии.

Удивительные факты сезонных изменений длины политенных хромосом и рисунка дисков были описаны Н. Б. Ильинской в 1978–1980 гг. у некоторых видов хирономусов. Оказалось, что перед началом холодов, в сентябре, хромосомы резко укорачиваются, уменьшается число пуфов, соседние диски во многих районах сливаются в блоки хроматина, фактически в новые диски. Удлинение хромосом начинается в январе—феврале, в результате чего в хромосомах у личинок, выловленных в марте, число дисков в четыре раза больше, чем у выловленных в сентябре: «зимние» блоки хроматина расщепляются на диски и междиски.

Похожие слияния—расщепления дисков происходят у некоторых летальных мутантов дрозофилы при длительном инкубировании органов, содержащих политенные хромосомы, в искусственных средах или гемолимфе имаго.

Таким образом, может быть сделано общее заключение о постоянстве и вариабельности рисунка дисков: он относительно постоянен в клетках нормально функционирующих органов, однако при изменении внутриклеточных или окружающих условий варьирует за счет объединения (слияния) или расщепления материала дисков.

Литература к разделу 13.6

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 182–208.

13.7. ПОЛИТЕНИЯ КАК ЯВЛЕНИЕ

Клетки с политенными хромосомами отличаются от митотически делящихся клеток целым рядом особенностей. Во-первых, формирование политенных хромосом ассоциируется с потерей всего механизма клеточного деления после каждого удвоения ДНК в ядре, в результате чего клеточный цикл в клетках этого типа состоит только из двух фаз — S, когда синтезируется ДНК, и G — межсинтетической. Такой тип клеточного цикла у дрозофилы устанавливается в середине эмбрионального развития.

Во-вторых, в конце каждого периода репликации дочерние хроматиды не сегрегируют (т. е. не расходятся друг от друга), они остаются спаренными. Один из генов дрозофилы, *escargot*, необходим для того, чтобы поддерживать цикл диплоидных клеток в имагинальных дисках. Этот ген не функционирует в личиночных тканях с политенными хромосомами. Предполагают, что его экспрессия подавляет развитие политении.

В-третьих, сформировавшиеся политенные хромосомы не способны вступать в митотические деления.

В-четвертых, ядерная оболочка и ядрышко остаются интактными в ходе следующих один за другими циклов репликации ДНК.

Политения возникает и достигает высоких степеней в тканях, органах или на тех стадиях развития, когда есть необходимость быстрого роста органа при неизменно высоком уровне функционирования. Органы, содержащие клетки с политенными хромосомами, как правило, вовлечены в процессы интенсивной секреции, осуществляемые в течение короткого времени на фоне быстрого роста. Таковы питающие клетки ооцитов, глоточные, шелкоотделительные, слюнные железы, трофобласт, антиподы, гаусторий, суспензор, эндосперм. Особенности политении создают предпосылки для выполнения этих функций. Поскольку в клеточном цикле полностью блокирован весь механизм деления ядра и клетки, процесс репликации хромосом максимально упрощен и ускорен. За счет политенизации масса органа нарастает значительно быстрее, чем за счет митотических делений диплоидных клеток. Очевидно также, что клеточный цикл по типу политении способствует сохранению высокой функциональной активности органа, так как нет перерывов, связанных с митозами.

Политения найдена у организмов, возникавших на всех этапах эволюции, например у инфузорий, появившихся, вероятно, еще в докембрии, более 600 млн лет назад, затем политения возникала вместе с появлением моллюсков (кембрий), ногохвосток (девон — почти 400 млн лет назад), крылатых насеко-

мых (карбон), двудольных растений (возможно, триас) и млекопитающих (конец триаса), однодольных растений (мел — около 100 млн лет назад).

Литература к разделу 13.7

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 332–334.

13.8. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

13.8.1. Диски

Распределение транскрипционно активных районов в политенных хромосомах изучали с помощью многих методов: специфических окрасок на РНК, световой и электронно-микроскопической авторадиографии после включения ^{3}H-уридина, локализации РНП-продуктов транскрипции, выявления гибридов ДНК—РНК. Транскрипционно активными в политенных хромосомах являются все структуры, обнаруживающие ту или иную степень декомпактизации: пуфы, разрыхленные диски, кольца Бальбиани, ядрышки, с большой долей вероятности — междиски. Поэтому генетическая организация этих структур представляет существенный интерес.

В 1970–1980-х гг. в генетике происходила бурная дискуссия о генетическом содержании хромомера. Фиксированное расположение дисков и междисковых участков в политенной хромосоме дрозофилы навело цитогенетиков на мысль, что каждый диск, возможно, соответствует отдельному гену. Основная масса исследователей полагала, что каждый хромомер содержит только один ген. Были и редкие оппоненты, доказывавшие идею о полигенной организации дисков.

Последующие эксперименты заставили усомниться в правильности гипотезы «один диск — один ген». Были клонированы многочисленные области генома дрозофилы длиной от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов. Затем отдельные фрагменты этих областей использовали в качестве зондов для идентификации матричных РНК (мРНК), синтезирующихся в данном участке. Этот метод позволяет выявить участки, кодирующие мРНК на физической карте ДНК, т. е. фактически гены. Как оказалось, число отдельных мРНК в 3–5 раз превышает число дисков.

По современным представлениям, число генов у дрозофилы составляет около 12 тыс., что заметно больше, чем число дисков. Эти данные свидетельствуют о том, что каждый диск должен содержать в среднем по нескольку генов.

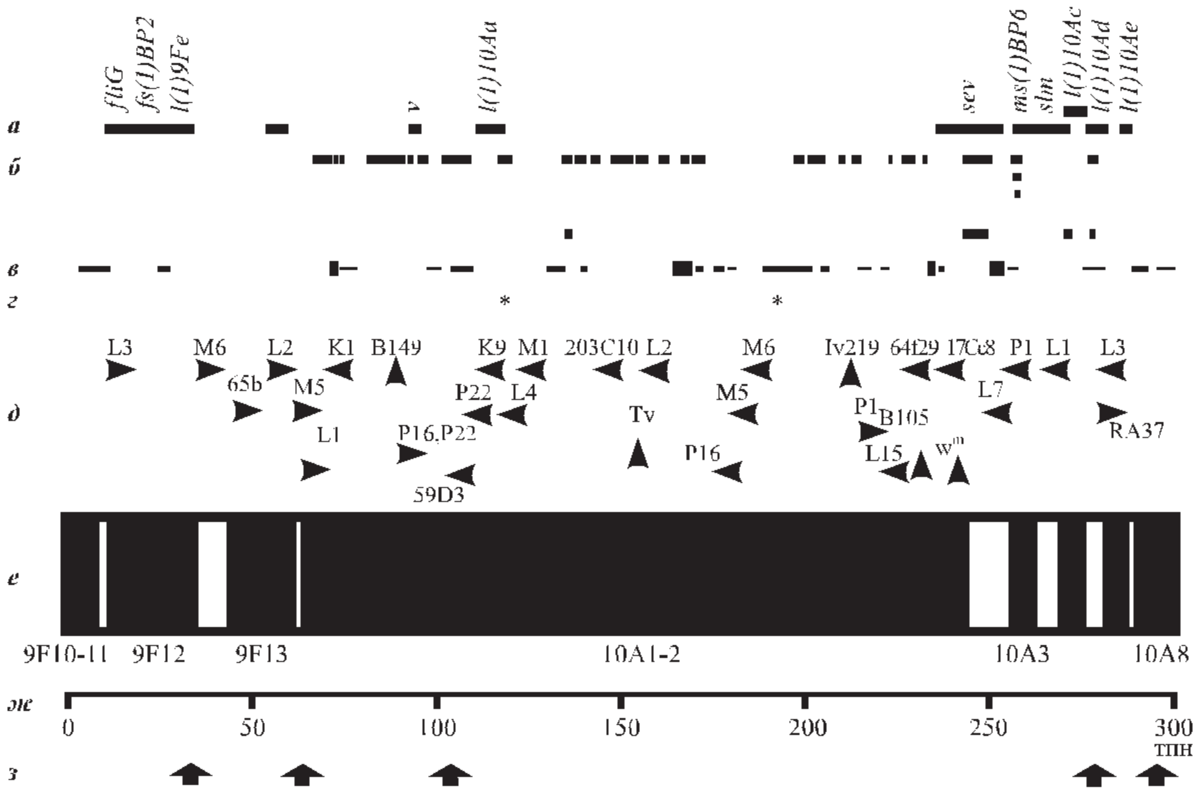
То же самое вытекает из рассуждений другого рода. Количество ДНК, входящей в состав одного диска, варьирует в хромосомах разных видов и в хромосомах одного и того же вида в пределах от 5 до 200 тпн и составляет в среднем 30 тпн. В то же время гены в молекуле ДНК занимают, как правило, более короткие отрезки. В диске 10А1-2 клонированный район длиной 190 тпн содержит почти 25 генов и кДНК, т. е. один ген на 7,6 тпн. Средняя плотность в районе генных комплексов *achaete–scute* и *Broad* составляет 1 ген на 8 тпн. В лаборатории Дж. Рубина в 1998 г. в результате полного определения последовательности нуклеотидов в участке ДНК длиной 2700 тпн, выделенной из района 34С4–36А2 второй хромосомы дрозофилы показано, что плотность генов составляет 1 на 13,7 тпн. Эти данные свидетельствуют о том, что средний диск должен содержать 3–5 генов.

Молекулярный и генетический анализ показал, что есть диски с очень большим числом генов, например, блоки из 160–200 идентичных последовательностей генов 5S рРНК, каждая длиной 385 пн, занимают группу из 4 дисков. Сотни копий генов 18S и 28S рРНК локализованы в ядрышковом организаторе, который у многих видов двукрылых выглядит как одиночный диск. Аналогичным образом устроены диски, содержащие многочисленные копии генов гистонов.

Единственное проведенное до сих пор генетическое и молекулярное исследование индивидуального диска (рис. 13.9) выявило наличие в нем около 25 генов. Часть из них определяется с помощью мутаций, другие обнаружены по их активности в синтезе РНК. Некоторые отрезки ДНК, входящей в состав диска 10А1-2 (см. рис. 13.9, *г*), обогащены повторами, т. е. одинаковыми последовательностями нуклеотидов, встречающимися в геноме десятки и сотни раз. Повторы, найденные в диске 10А1-2, характерны только для половой *X*-хромосомы. Они расположены гнездами по нескольку копий подряд, и эти гнезда распределены вдоль *X*-хромосомы примерно в двух десятках районов. Роль этих повторов не выяснена.

Можно было бы предположить, как это и делали многие генетики, что гены, расположенные в одном диске, участвуют в осуществлении какой-то одной функции или находятся

Рисунок 13.9



Молекулярно-генетическая организация диска 10А1-2 политенной хромосомы дрозофилы [Жимулёв, 1994. С. 126]:

а — гены, выявляемые с помощью мутаций; *б* — гены, выявленные по локализации матричных РНК; *в* — участки АС-повторов; *г* — повторенные участки ДНК; *д* — хромосомные перестройки (вертикальные линии с флажками указывают точку разрыва ДНК, стрелка флажка — направление перестройки); *е* — диски 9F10–10A8 изучаемого района; *ж* — физическая карта ДНК (границы дисков соответствуют протяженности ДНК, входящей в тот или иной диск, например, диск 10А1-2 занимает около 180 тпн); *з* — точки «эволюционных» разрывов ДНК (указаны стрелками) у близких видов *D. virilis, D. repleta* и *D. hydei*

под общим контролем, т. е. функционируют координированно. Однако это оказалось не так. На рис. 13.9, *д* показаны точки разрывов многочисленных хромосомных перестроек, таких как инверсии, делеции и транслокации. С их помощью часть материала диска может быть перенесена в другое место в этой же хромосоме или в другие хромосомы или даже удалена. В результате одна группа генов диска переносится в соседство с другими генами, и целостность генной группировки диска нарушается. Однако это не отражается на их активности: даже будучи разобщенными, все гены диска функционируют нормально.

Еще интереснее оказались результаты эволюционного исследования диска 10А1-2. Клонированные последовательности ДНК, составляющие этот диск у *D. melanogaster* — основного объекта исследований, были картированы в хромосомах у других видов, эволюционно разошедшихся около 10 млн лет назад: у *D. virilis, D. repleta, D. hydei.* У этих видов ДНК диска 10А1-2 оказалась представленной в двух независимых дисках *X*-хромосомы: ДНК между второй и третьей стрелкой слева на рис. 13.9, *з* у этих видов локализована в одном (тонком) диске, а ДНК из района между третьей и четвертой стрелкой — в другом (более толстом) диске. Таким образом, нормально работающая группа генов, заключенных в одном диске у *D. melanogaster*, нормально работает также в составе разных дисков у других видов. Все это свидетельствует об отсутствии функциональной сцепленности различных генов, входящих в состав диска.

Оригинальный подход к исследованию организации дисков дает метод трансформации, использование которого позволяет встраивать в геном фрагменты ДНК с известными молекулярно-генетическими характеристиками.

В состав трансформирующих конструкций входят различные фрагменты ДНК: части мобильного *P*-элемента, маркерные гены (*rosy*, *Adh*, гены теплового шока, β-галактозидазы *E. coli*), экспрессирующиеся гены плазмиды.

Согласно данным электронно-микроскопического анализа, проведенного В. Ф. Семешиным, в 10 из 13 изученных районов, в которых произошла инсерция, образуется по одному новому диску, возникшему из ДНК транспозона. Последовательности ДНК, заключенные в таких искусственных дисках, полностью сохраняют свою активность: маркерные гены нормально функционируют, а гены теплового шока легко активируются с образованием пуфа. Эти факты позволяют сделать следующие важные выводы.

1. Поскольку из разнородной в функциональном смысле ДНК образуется единственный диск, очевидно, что вся ДНК подвергается сплошной компактизации, без диск-междискового рисунка. Это означает, что расположение гена в обеих структурах (диск и междиск) не является необходимым и диски функционально не связаны с междисками, т. е. нет оснований говорить о цитогенетической единице, состоящей из диска и междиска. Если в нормальной политенной хромосоме какой-то из генов, например *rosy*, был бы связан с прилежащим междиском и эта связь была бы функционально необходимой, то в составе трансформирующей конструкции рядом с компактной ДНК гена *rosy* должен был бы возникнуть междиск. Аналогичные рассуждения справедливы и по отношению к другим генам, а раз так, то в результате трансформации на месте инсерции должна была возникнуть серия дисков и междисков в соответствии с числом генетических единиц в инсерции. Однако этого не наблюдается.

2. Все гены, взятые из разных дисков и междисков и даже из ДНК *E. coli*, находящиеся в инсерции, компактизуются в один диск, значит, механизмы компактизации неспецифичны для разных генов.

13.8.2. Междиски

Участки политенных хромосом, расположенные между дисками (хромомерами), называют междисками (межхромомерами). По данным, полученным на многих видах двукрылых, длина междисков колеблется в пределах 0,05–0,38 мкм, чаще всего 0,1–0,2 мкм, или 0,3–3,8 тпн. Количество ДНК, приходящееся на все междиски, составляет 3–5 % от ее общего количества в политенных хромосомах.

Рисунок 13.10

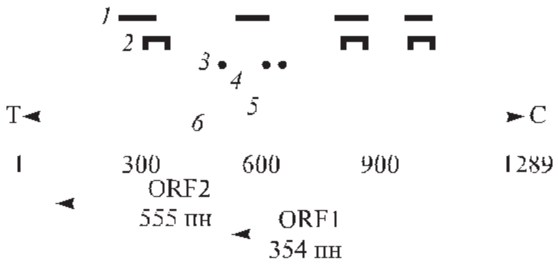


Схема распределения мотивов в ДНК междиска 61С7/61С8 у дрозофилы [Жимулёв, 1994. С. 98]:

1 — районы прямых и инвертированных повторов; *2* — z-ДНК; *3* — районы связывания топоизомеразы II; *4* — автономно реплицирующиеся сайты; *5* — участки прикрепления скаффолда; *6* — участок встраивания инсерции; ORF — открытые рамки считывания; С — центромера; Т — теломера

О генетической функции междисков еще предстоит узнать, так как до настоящего времени в этой области известно мало. Было показано, что при инсерции транспозонов в междиски жизнеспособность у гомозигот по инсерциям не изменяется. Не было найдено и какого-то другого мутантного фенотипа.

Недавно была выделена ДНК одного из междисков и расшифрована ее первичная структура. Применили следующий оригинальный подход: из ДНК дрозофил, имеющих встройку транспозона в междиск, была изготовлена библиотека клонов, из которой, использовав ДНК транспозона в качестве зонда, выделили ДНК, имеющую фрагменты транспозона и междиска. Последний фрагмент использовали в качестве зонда для поиска клона ДНК, содержащего полноразмерный междиск.

Последовательности нуклеотидов междиска были секвенированы и проанализированы с помощью компьютерных программ. Оказалось, что фрагмент ДНК длиной 1289 пн, заключающий в себе материал междиска, имеет следующие особенности (рис. 13.10):

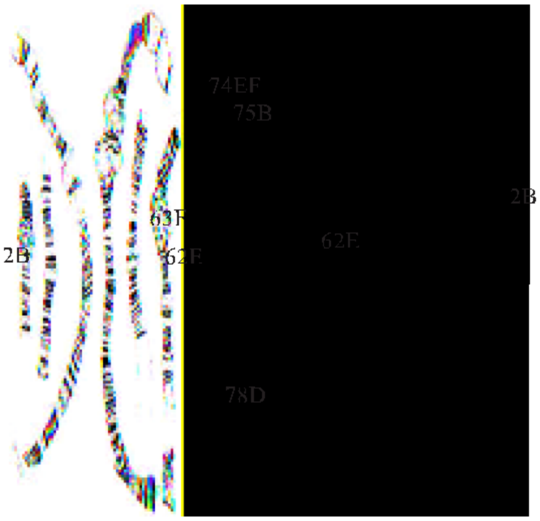
1. Является уникальным, поскольку в геноме нет других фрагментов, гомологичных ДНК междиска.

2. Обогащен (53,4 %) А–Т-парами нуклеотидов.

3. В его пределах найдено 14 мотивов различных регуляторных элементов и две перекрывающиеся рамки считывания, одна длиной 555 пн, другая — 354 пн. Один из мотивов гомологичен сайту посадки топоизомеразы II и участку прикрепления ядерного скаффолда.

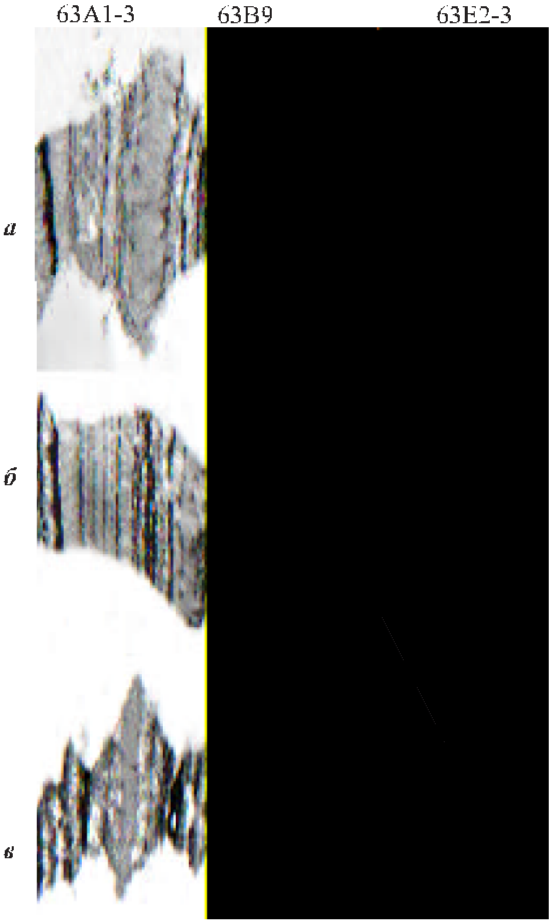
4. Частота использования кодонов в рамках считывания, найденных в ДНК междиска, отлична от той, которая определяется в генах,

Рисунок 13.11



Изображения некоторых пуфов
в политенных хромосомах дрозофилы
[Becker, 1962. — Из: Жимулёв, 1994]

Рисунок 13.12



Электронно-микроскопическая фотография экдизон-индуцируемого пуфа 63Е и пуфа теплового шока 63В в третьей хромосоме дрозофилы. Район хромосомы 63А–С до (*б*) и после (*в*) теплового шока, до (*б*) и после (*а*) индукции экдизоном. Фотографии любезно предоставлены В. Ф. Семешиным

кодирующих белки у дрозофилы. Это может свидетельствовать либо о том, что эти рамки считывания не кодируют информацию для синтеза, либо о том, что они кодируют белки с использованием редких кодонов.

13.8.3. Пуфы

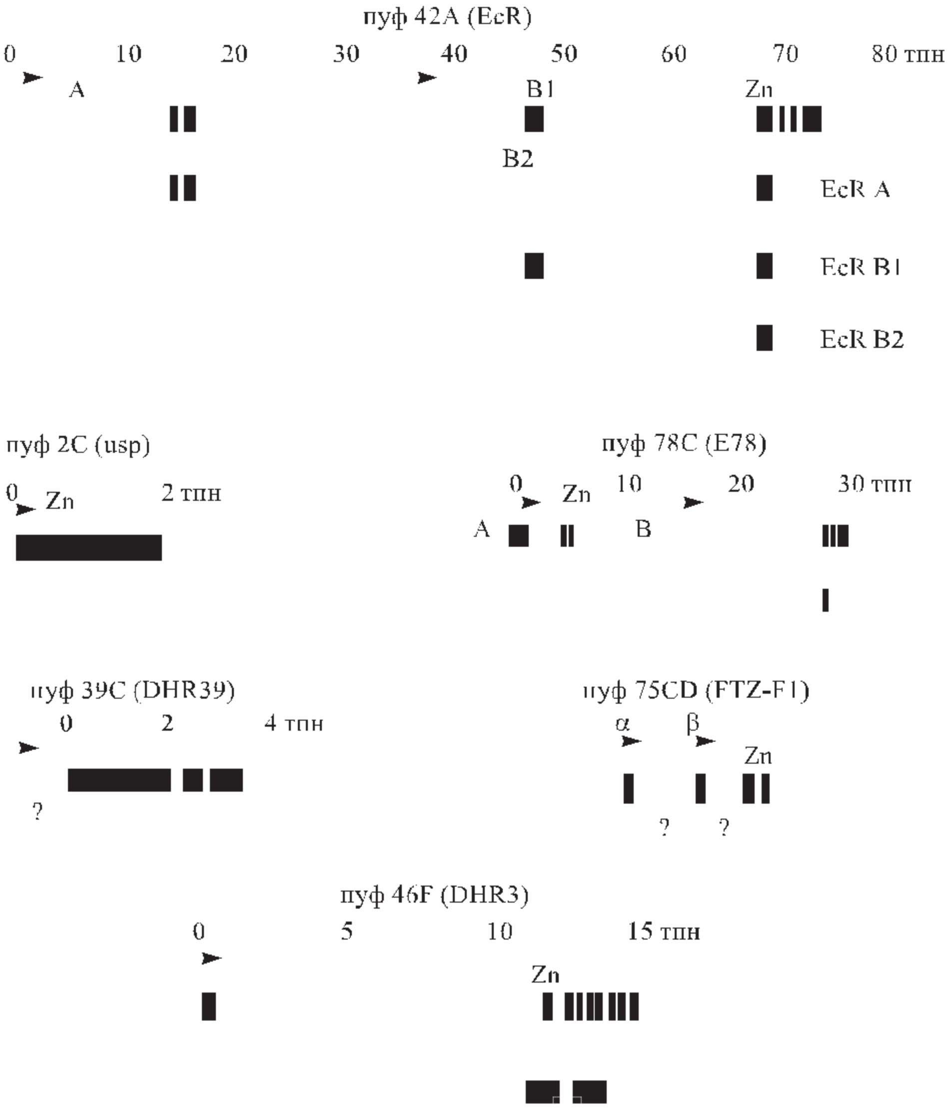
Вздутия в политенных хромосомах были описаны одновременно с политенными хромосомами: Бальбиани в 1881 г. нашел огромные муфтоподобные вздутия в политенных хромосомах *Ch. plumosus*, которые в 1910–1912 гг. Х. Эрхард и Ф. Альвердес назвали кольцами Бальбиани.

Одной из выдающихся особенностей третьей хромосомы дрозофил Пайнтер в 1935 г. назвал серию слабоокрашенных сегментов. Эти сегменты обнаруживают поразительное варьирование диаметра, хотя у каждой конкретной личинки их форма и размеры довольно константны (рис. 13.11, 13.12). У некоторых особей они могут быть в три раза толще, чем остальная часть хромосомы, у других личинок утолщений в данных районах нет, в них обычные диски. К. Бриджес в том же году назвал некоторые из вздутий, например в районе 2В, пуфами. Работая с хромосомами личинок сциарид, Д. Полсон и Ч. Метц нашли, что гигантские вздутия, характерные для этого вида, формируются из дисков, а затем вздутия вновь превращаются в диски.

Детальные исследования В. Беермана, К. Павана, М. Бройер и Ф. Мехельке в начале 50-х гг. привели авторов к заключению о том, что пуфы и кольца Бальбиани являются районами хромосом, в которых гены находятся в активном состоянии, т. е. разрыхление материала диска и формирование из него специфического пуфа есть морфологическое проявление активирования гена, коррелирующее с определенным состоянием дифференцировки.

Разрыхление материала диска связано с тем, что в области активируемого гена происходит накопление сначала различных белков, входящих в транскрипционные комплексы, а затем вновь синтезируемой РНК и белков, упаковывающих эту РНК в специфические гранулы, в составе которых она транспортируется из ядра в цитоплазму. Пуфы — это участки хромосом, наиболее активные в транскрипции. Око-

Рисунок 13.13



Молекулярная организация генов, локализованных в некоторых пуфах дрозофилы [Huet et al., 1995. — Из: Zhimulev, 1999. P. 321].

Цифрами вверху обозначена протяженность участка ДНК, занимаемого геном, прямоугольниками показаны экзоны, соединяющие их зигзагообразные линии — интроны. Несколько рядов экзонов–интронов представляют различные изоформы белков, транслируемые с генов в результате альтернативного сплайсинга

ло 50 % включения ^{3}H-уридина в клетках слюнных желез приходится на пуфы.

В 1961 г. В. Беерман нашел корреляцию между появлением гранул секреции в клетках особой доли слюнной железы *Ch. pallidivittatus* и активностью дополнительного кольца Бальбиани в клетках этой доли. Таким образом впервые была обнаружена связь между активностью пуфа и продуктом, синтезируемым клеткой.

За последние 10 лет выделена и клонирована ДНК примерно двух десятков пуфов. Эта ДНК, как оказалось, содержит гены, имеющие очень большую протяженность — 50–120 тпн. В составе генов — многочисленные экзоны, вступающие в альтернативный сплайсинг, и очень длинные (до 40 тпн) интроны (рис.13.13).

Литература к разделу 13.8

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. 564 с.

Zhimulev I. F. Genetic organization of polytene chromosomes // Advances in Genetics. 1999. Vol. 39. P. 1–599.

13.9. ГОРМОНАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ПУФОВ

У многих видов отряда Diptera, у которых личиночное развитие проходит быстро (за несколько дней), картины пуфов сменяют друг друга очень быстро, и эти изменения легко наблюдаются. У наиболее изученного вида — дрозофилы — детально описано пуфирование всех хромосом на протяжении последних 24 ч личиночного развития и 12 ч — предкуколочного. Все пуфы можно разделить на два типа: крупные, или собственно вздутия, и малые, в которых увеличения диаметра хромосомы нет, однако диски данного района уже разрыхлены, деконденсированы, т. е. транскрипционно активны.

Каждая стадия развития личинки или предкуколки характеризуется определенным набором (паттерном) крупных пуфов. В ходе развития эти наборы закономерно изменяются (рис. 13.14).

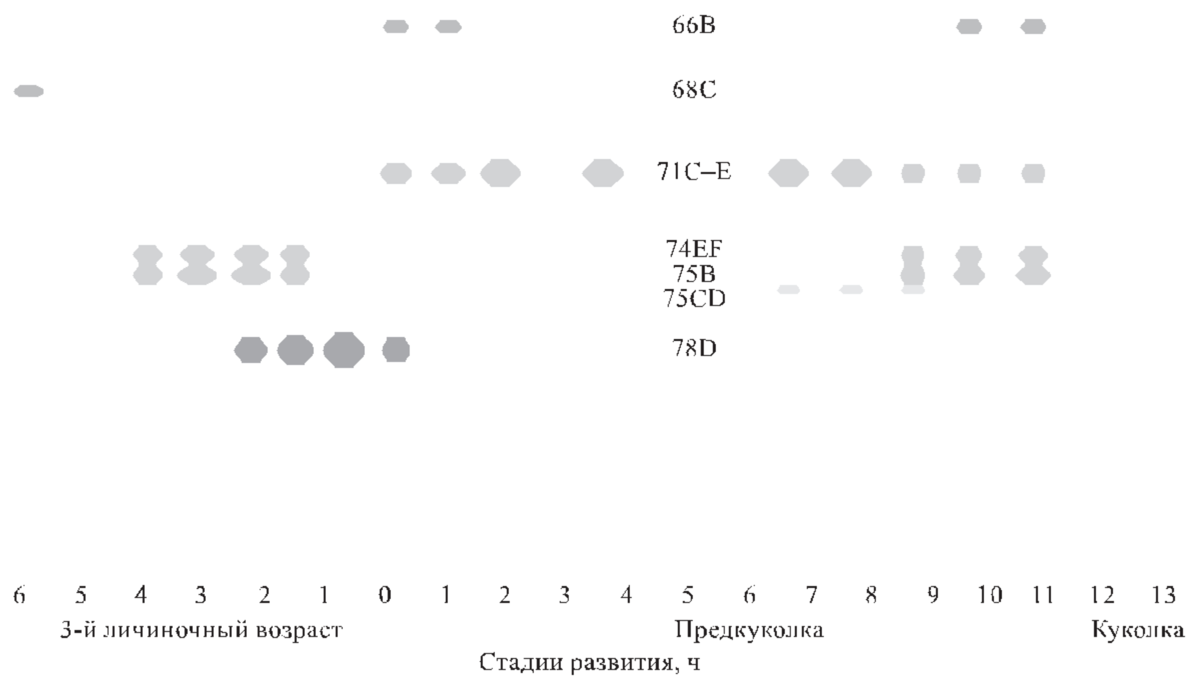
У наиболее молодых личинок, у которых политенные хромосомы уже достаточно крупные и доступны для анализа, присутствуют только так называемые межлинечные пуфы (68C на рис. 13.14). В самом конце личиночного развития, примерно за 6 ч до формирования предкуколки (пупариума), на фоне резкого повышения титра гормона экдизона эти пуфы инактивируются и начинают формироваться другие пуфы, сначала ранние, т. е. раньше других (примерно через 30 мин) среагировавшие на поступление гормона (74EF и 75B), затем поздние — реагирующие с задержкой на несколько часов (78D, 66B, 71C–E).

У предкуколок в момент формирования пупариума (0 ч) активность пуфов наивысшая, в том смысле что именно на этой стадии развития наибольшее число пуфов в геноме активно и размеры многих пуфов максимальны.

После достижения пика в последующие 2–3 ч происходит быстрый спад активности пуфов, когда в хромосомах присутствуют единичные пуфы. В конце стадии предкуколки (опять на фоне повышенного титра экдизона) возникает повторная волна активности ранних и поздних пуфов.

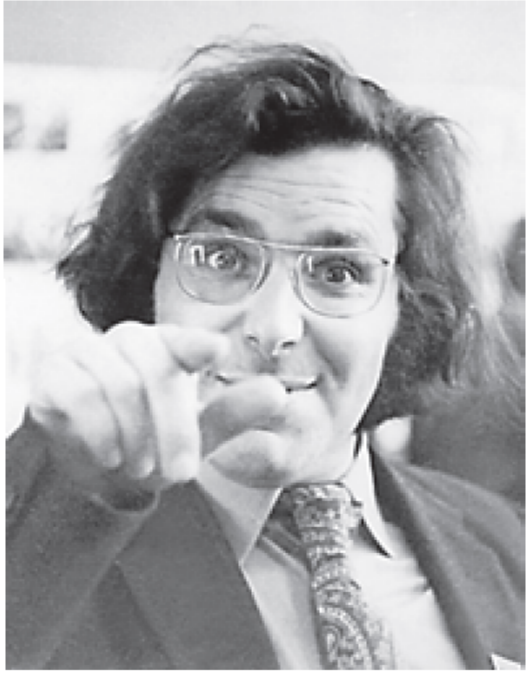
Эти волны находятся под контролем стероидного гормона экдизона, регулирующего развитие насекомых. В результате исследования взаимоотношений экдизона и пуфов были открыты наиболее основополагающие механизмы действия стероидных гормонов в целом, причем задолго до того, как появились высокораз-

Рисунок 13.14



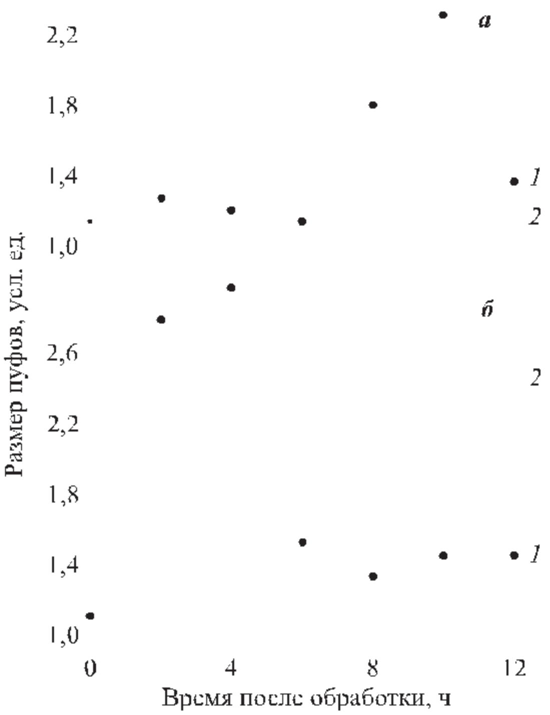
Изменения активности пуфов 3L-хромосомы дрозофилы в онтогенезе
[Becker, 1962. — Из: Жимулёв, 1994. С. 209]

Рисунок 13.15



Майкл Эшбернер
(р. 1942)

Рисунок 13.16



Развитие позднего пуфа 82F (*а*) и раннего пуфа 75B (*б*) под воздействием экдизона (*1*) или экдизона с ингибитором синтеза белка циклогексимидом (*2*) [Ashburner, Richards, 1976. — Из: Жимулёв, 1994. С. 264]

решающие методы молекулярно-генетического анализа.

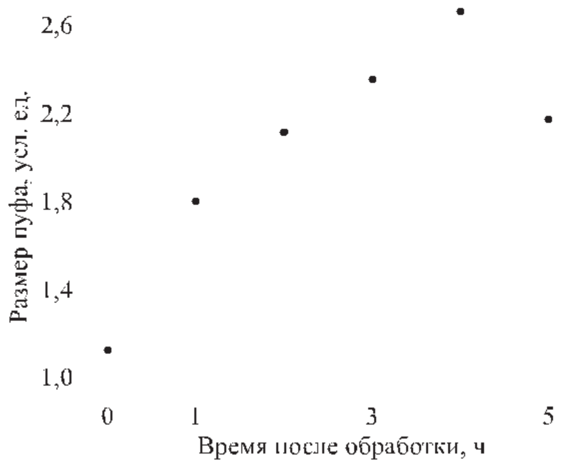
В 1959 г. Х. Беккер (H. Becker) установил, что мутация гена *l(2)gl*, экспрессирующегося в кольцевой железе, вырабатывающей экдизон, останавливает формирование пуфов. В 1960 г. У. Клевер и П. Карлсон (U. Clever, P. Karlson), инкубируя слюнные железы *in vitro* в растворе с гормоном, индуцировали пуфы, которые появляются в нормальном развитии на фоне высокой концентрации экдизона. Таким образом впервые установили, что гормоны осуществляют свое действие, активируя гены. В 1964 г. У. Клевер обнаружил, что экдизон вызывает целый каскад взаимосвязанных изменений, в которых гены, активируемые гормоном раньше, влияют на индукцию генов, более поздно реагирующих на гормон.

Наиболее фундаментальные исследования процесса активирования генов (пуфов) под действием гормона экдизона провел английский генетик М. Эшбернер (M. Ashburner) (рис. 13.15).

Исследования гормональной регуляции активности генов удобнее проводить не на живом организме, а в системе *in vitro*, т. е. инкубируя органы в пробирке, благодаря чему можно по усмотрению экспериментатора изменять условия обработки гормонами — варьировать их концентрации, продолжительность воздействия, использовать вещества, прерывающие протекание различных процессов (ингибиторы). В результате серии остроумных экспериментов М. Эшбернер показал, что ранние и поздние пуфы различаются по многим признакам.

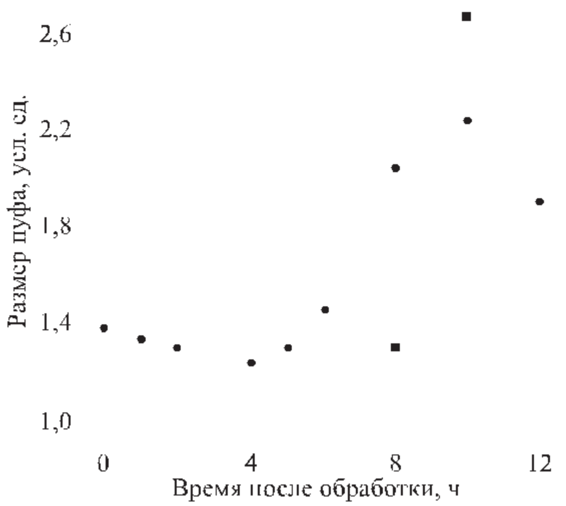
Во-первых, это реакция на ингибиторы синтеза РНК и белков. Если через час после начала инкубации клеток слюнных желез с ингибитором синтеза белков — циклогексимидом добавить гормон экдизон, ранние пуфы все же образуются, т. е. для их индукции не требуется предварительного синтеза белков. Они используют те белки, которые были синтезированы задолго до этого. В поведении ранних пуфов обнаружилась еще одна удивительная особенность. Обычно они быстро реагируют на гормон — активируются, через четыре часа развиваются до максимальных размеров, затем полностью инактивируются, и материал пуфа, компактизуясь, превращается в диск. В присутствии ингибитора синтеза белка ранние пуфы нормально активируются, но их обычная инактивация не происходит (рис. 13.16, *б*). Этот факт может свидетельствовать только об одном: инактивация ранних пуфов — такой же

Рисунок 13.17



Влияние удаления экдизона из инкубационной среды на размер раннего пуфа 74EF [Ashburner, Richards, 1976. — Из: Жимулёв, 1994. С. 267]. Сплошная линия — изменение размера пуфа в среде с гормоном, штриховая — при отмывке экдизона

Рисунок 13.18



Преждевременная индукция позднего пуфа 82F в результате отмывки экдизона после 4 часов инкубации с гормоном [Ashburner, Richards, 1976. — Из: Жимулёв, 1994. С. 268]. Сплошная линия — инкубация слюнных желез в среде с гормоном, штриховая — без гормона

гормонально-индуцируемый процесс, как и их индукция. Отсюда вытекает другой важный вывод: белки, выключающие активность ранних пуфов, кодируются в самих ранних пуфах.

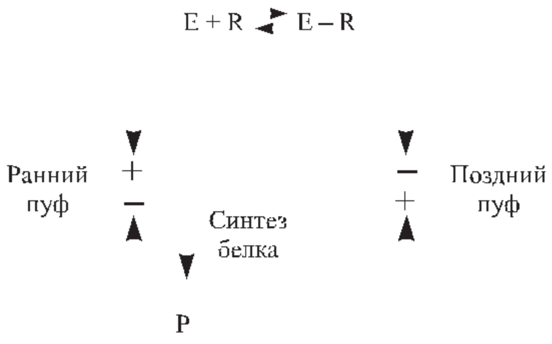
Поздние пуфы на фоне ингибирования синтеза белка не индуцируются (рис. 13.16, *а*). Это означает, что для их индукции необходимы белки, синтезируемые под действием гормона экдизона, т. е. в ранних пуфах.

Во-вторых, как оказалось, ранние и поздние пуфы еще более различаются по реакции на удаление гормона из клеток. Если некоторое время инкубировать железы в пробирке в растворе, содержащем гормон, а затем поместить в новый раствор, но уже без гормона, ранние пуфы быстро уменьшаются в размерах и исчезают совсем (рис. 13.17). На индукцию поздних пуфов отмывка гормона влияет очень специфично. Если удалять гормон через 1, 2, 3 ч от начала инкубации, то ничего не происходит. Если инкубация уже протекала 4 и более часа, то удаление гормона приводит к быстрой преждевременной индукции поздних пуфов (рис. 13.18). Эти результаты означают, что для поддержания активности ранних пуфов гормон нужен постоянно. Этот же гормон до определенного времени блокирует развитие поздних пуфов.

Для объяснения результатов своих опытов М. Эшбернер предложил следующую модель (рис. 13.19). Гормон (E) обратимо связывается с молекулой белка рецептора (R). Рецептор облегчает проникновение гормона в клетку и связывание гормона с генами. Гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными областями генов, расположенных в ранних пуфах, и активирует их. Для активности ранних пуфов нужно постоянное присутствие гормона. Отмывка его приводит к инактивации этих генов. В то же время гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными районами генов в поздних пуфах и инактивирует их. По прошествии некоторого времени после начала действия гормона нарабатываются белковые продукты (P) генов из ранних пуфов, которые действуют двояко. Некоторые из этих белков инактивируют прежде активные ранние пуфы. Поэтому подавление синтеза белка предотвращает инактивацию ранних пуфов. Другие белки из этой категории связываются с регулирующими зонами поздних генов, вытесняют экдизон-рецепторный комплекс, в результате чего активируются поздние пуфы. Очевидно, что если подавить синтез белка, то поздние пуфы развиваться не будут: в клетках еще не синтезированы белки P.

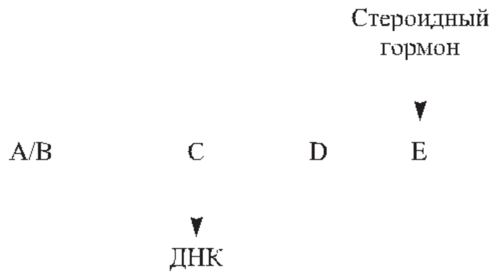
Легко объяснить роль отмывки гормона. Поскольку для поддержания активного состояния ранних пуфов необходимо постоянное пребывание комплекса ER на регуляторных районах генов, то удаление гормона приводит к быстрой инактивации пуфов. Сложнее с реакцией поздних пуфов на отмывку. Если начать

Рисунок 13.19



Модель индукции ранних и поздних пуфов экдизоном [Ashburner et al., 1974. — Из: Жимулёв, 1994. С. 268]

Рисунок 13.20



Обобщенная схема строения молекулы белка-рецептора стероидного гормона [Pongs, 1985. — Из: Жимулёв, 1994. С. 301]: A/B — домен с неизвестными функциями; C — домен связывания с ДНК; D — ?; E — домен связывания со стероидным гормоном — лигандом

удалять гормон слишком рано, когда белки P еще не синтезированы, то отмывка не вызывает преждевременной индукции поздних пуфов. Белки P синтезируются примерно через 3–4 ч после начала действия гормона. Если отмыть экдизон в это время, то количество белков P в клетках уже достаточное для того, чтобы вытеснить из регуляторных районов генов комплекс ER, концентрация которого к тому же быстро уменьшается в результате отмывки. Если в пробирку, откуда гормон уже удален, вновь добавить экдизон, поздние пуфы вновь инактивируются (см. рис. 13.18).

Модель, изображенная на рис. 13.19, описывает взаимодействие только тех пуфов, которые активны в конце личиночного развития, т. е. в течение последних 6 ч (от 6 ч до 0, см. рис. 13.14). Другой английский генетик — Дж. Ричардс (G. Richards) в серии остроумных опытов установил наличие каскадных взаимодействий между пуфами предкуколки (0–12 ч на рис. 13.14).

Как выяснилось, некоторые пуфы политенных хромосом кодируют белки-рецепторы. Интересно, что гены рецепторов располагаются как в межлинечных (42A), так и в ранних (74EF), поздних (2C) и даже предкуколочных (75CD, 93F) пуфах.

Выяснилось также, что белковые молекулы-рецепторы весьма консервативны, т. е. независимо от того, какой это рецептор и даже какой из стероидных гормонов он связывает, все рецепторы имеют общий принцип строения (рис. 13.20). Все молекулы белков-рецепторов состоят из 4–5 специфических участков — доменов. Один из доменов (C) отвечает за связывание комплекса ER с ДНК, т. е. находит именно тот ген, который необходимо активировать. Этот домен содержит 66–68 аминокислот.

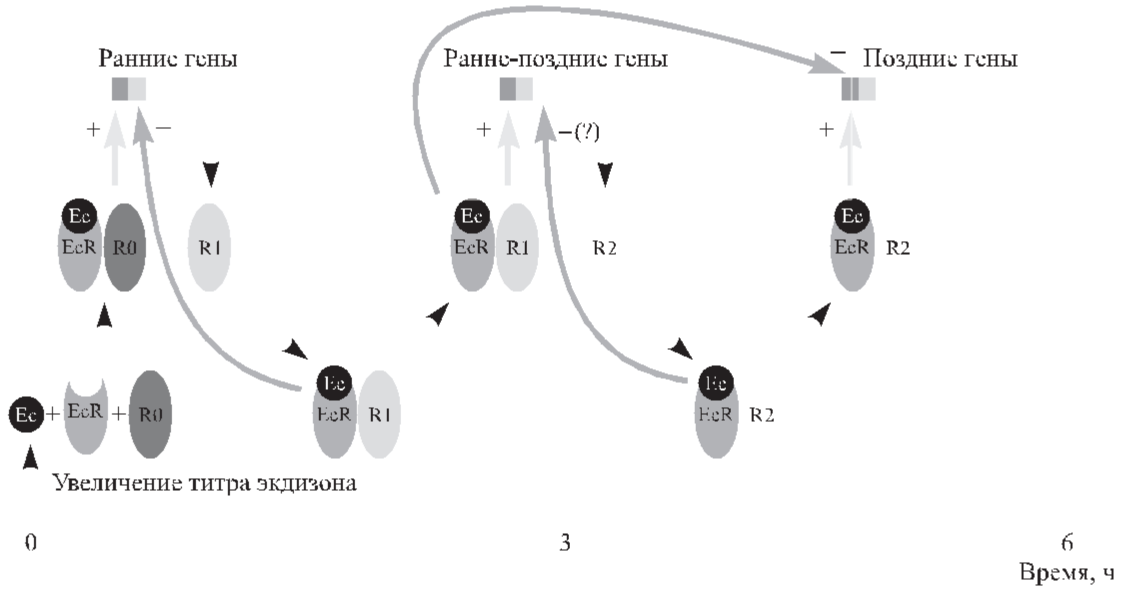
Другой домен (E) необходим для удержания гормона в комплексе. Он содержит 220 аминокислот. Функции доменов A/B и D пока не определены.

С учетом этих факторов модель каскадного активирования генов под влиянием экдизона была дополнена Дж. Ричардсом (рис. 13.21). Согласно новому варианту модели, при увеличении титра гормона его молекулы связываются с двумя молекулами белков-рецепторов: EcR и R0. Этот комплекс поступает на регуляторные участки ранних генов и активирует их. Продуктом раннего гена является другой рецепторный белок — R1, который в гормон-рецепторном комплексе замещает белок R0 или EcR или оба этих белка. Образовавшийся в результате этого новый гормон-рецепторный комплекс Ec–EcR–R1 подавляет активность ранних генов и активирует пуфы, возникающие несколько позже ранних. В научной литературе их называют ранне-поздними. Кроме этого вновь образованный комплекс связывается с регулирующими участками поздних генов и инактивирует их. Одним из продуктов активности ранне-поздних пуфов является новый белок-рецептор R2, который образует комплекс с гормоном, заменяя в старом комплексе EcR или R1 либо оба белка. Новый комплекс отключает гены, которые произвели сам R2, и одновременно включает поздние гены.

В этой схеме многое еще остается невыясненным, в частности, в каких пуфах расположены гены, кодирующие рецепторы R1 и R2, какую роль играют остальные пуфы. Известно, что в политенных хромосомах функционирует около 120 крупных пуфов и 220 мелких. Пока выяснена роль только примерно 20 пуфов.

Исследованиями И. Ф. Жимулёва, Е. С. Беляевой и их коллег в начале 80-х гг. было ус-

Рисунок 13.21



Модель активирования каскада генов в клетках слюнных желез дрозофилы с помощью гормона экдизона [Richards, 1992. — Из: Жимулёв, 1994. С. 305]:
Ec — экдизон; EcR — продукт гена *EcR* (белок-рецептор из пуфа 42A); R0 — рецептор из этой же группы, что и EcR; R1 и R2 — продукты соответственно ранних и ранне-поздних пуфов

тановлено, что каскад изменений генной активности в свою очередь находится под генетическим контролем. Был открыт и клонирован ген, названный впоследствии *BR-C*, мутации которого делают клетку нечувствительной к гормону. Связано это с тем, что ген *BR-C* кодирует фактор транскрипции, запускающий весь каскад генной активности, индуцируемый экдизоном. Белок оказался очень консервативным и контролирует экдизоновую индукцию у всех насекомых.

В те же годы теми же авторами был открыт ген *swi*, контролирующий передачу сигнала от ранних пуфов поздним.

Таким образом, в результате непосредственного наблюдения политенных хромосом под микроскопом удалось выявить два типа активных районов в интерфазных ядрах: междиски и пуфы, возникающие при декомпактизации материала дисков. Районы обоих типов транскрипционно активны. В состоянии дисков гены неактивны. Активирование генов, расположенных в дисках, происходит специфично по отношению к стадии развития или определенной ткани. Материал декомпактизуется, и ген начинает работать. Междиски всегда находятся в декомпактизованном состоянии. По-видимому, они постоянно, т. е. в большинстве тканей и на всех стадиях развития, активны.

Литература к разделу 13.9

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 259–306.

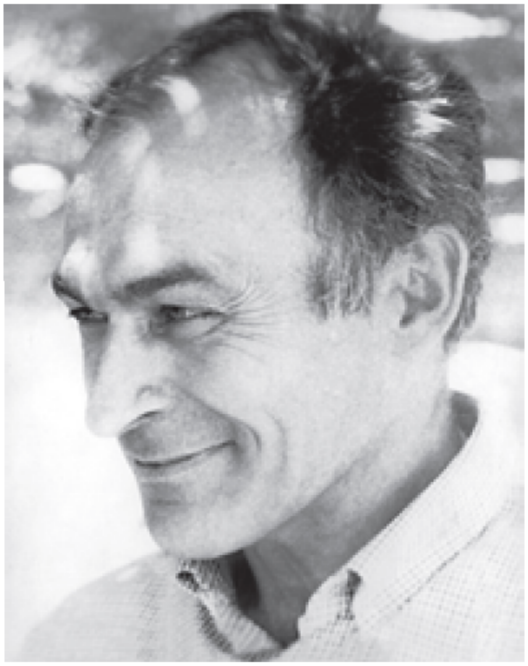
Richards G. The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila* // Advances in Developmental Biology. 1997. Vol. 5. P. 81–135.

Russel S., Ashburner M. Ecdysone-regulated chromosome puffing in *Drosophila melanogaster* // Metamorphosis. Academic Press, 1996. P. 109–144.

13.10. ПУФЫ ТЕПЛОВОГО ШОКА И СИНДРОМ КЛЕТОЧНОГО СТРЕССА

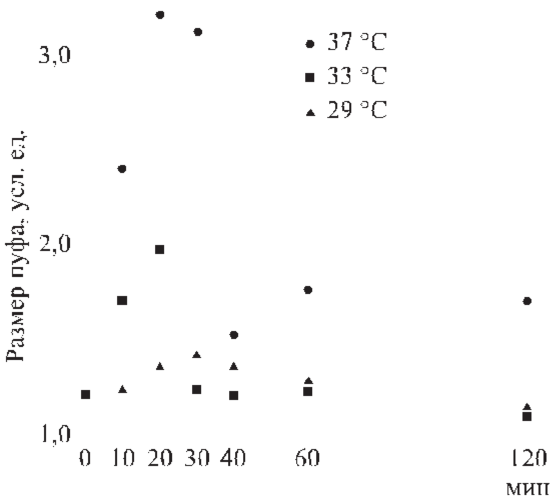
Когда пришло понимание того, что пуфы представляют собой морфологическое проявление генетической активности, начались многочисленные эксперименты, в которых пытались модифицировать активность пуфов с помощью различных соединений и факторов среды. Фактически сразу же были получены результаты. Помещая личинок *Drosophila busckii* в условия повышенной температуры, Ф. Ритосса (F. Ritossa) (рис. 13.22) в 1962 г. индуцировал несколько новых пуфов (см. рис. 13.12), которые возникали также в ответ на обработку

Рисунок 13.22



Ферруччио Ритосса
(р. 1936)

Рисунок 13.23



Изменение размера пуфа теплового шока 87C1
у дрозофилы в зависимости от времени
и температуры обработки
[Lewis et al., 1975. — Из: Жимулёв, 1994. С. 318]

клеток ферментными ядами, блокирующими окислительное фосфорилирование. Эти данные привели к открытию новой клеточно-физиологической системы, отвечающей на различные типы стрессов на клеточном уровне. Явление назвали синдромом теплового шока.

Пуфы теплового шока найдены у всех изученных видов, имеющих политенные хромосомы. Их число в геноме варьирует от 1 до 9. Оптимальная температура индукции — 35–37 °C. Кроме высокой температуры пуфы теплового шока индуцируются многими другими агентами, нарушающими процессы окислительного фосфорилирования, дыхания, ингибиторами транспорта электронов, акцепторов водорода и др. Таких агентов выявлено более сотни.

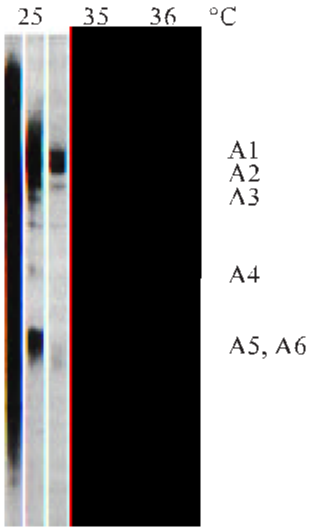
Реакция клеток на индуцирующие факторы очень быстрая: формирование пуфов начинается уже через одну минуту после повышения температуры, в течение 20–30 мин размеры пуфов достигают максимума, затем в течение нескольких часов они регрессируют (рис. 13.23). Если тепловой шок сохраняется более одного часа, регрессируют пуфы нормального развития, активные в момент повышения температуры.

На уровне процессов синтеза РНК и последующей трансляции выявляется несколько типов ответов:

1. Быстро индуцируется синтез РНК в пуфах теплового шока.
2. Инактивируется транскрипция большинства генов, не кодирующих белки теплового шока. Фактически прекращается весь синтез РНК, осуществляемый РНК-полимеразой II. На электрофореграммах РНК, выделенная из клеток при нормальной (25 °C) температуре, представлена сплошным мазком (рис. 13.24), что свидетельствует о широком варьировании размеров молекул. Под действием теплового шока синтезируется лишь несколько фракций, кодируемых в пуфах теплового шока.
3. Под действием теплового шока уже через 10 мин появляются новые полисомы, содержащие вновь синтезированные мРНК, считанные с генов теплового шока. На фореграммах начинают появляться белки теплового шока и одновременно с этим прекращается синтез других полипептидов (рис. 13.25). Остановка синтеза белка связана с очень быстрым разрушением предсуществующих полисом.

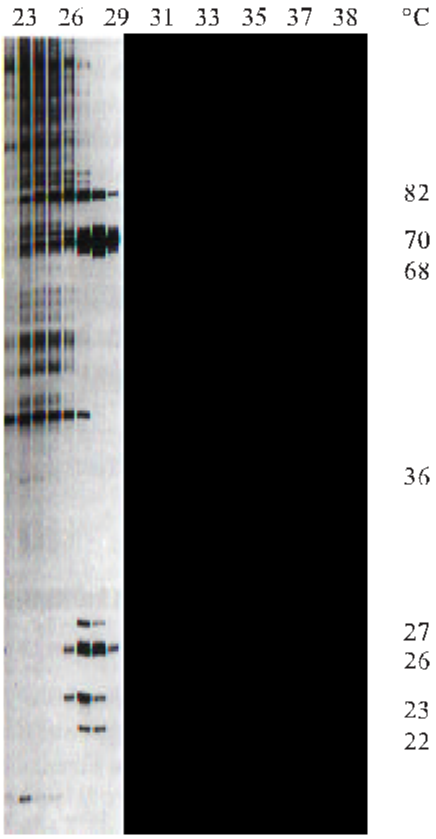
Легкость обнаружения полипептидов, синтезируемых в условиях теплового шока, на электрофореграммах дала возможность изучать ответ генома на стрессирующие факторы в клетках организмов, не имеющих политенных хромосом. С помощью электрофореза белков удалось обнаружить, что синдром теплового шока развивается у всех видов животных, растений и микроорганизмов. Белки теплового шока (БТШ) у всех организмов представлены

Рисунок 13.24



Электрофореграмма цитоплазматической поли(A)$^{+}$РНК в клетках дрозофилы при разных температурах [A. Spradling. — Из: Ashburner, Bonner, 1979]. A1–A6 — фракции РНК теплового шока

Рисунок 13.25



Электрофореграмма белков, синтезируемых в культуре клеток дрозофилы [S. L. McKenzie. — Из: Ashburner, Bonner, 1979].
Цифры справа обозначают молекулярную массу синтезируемых полипептидов (кДа)

большим набором полипептидов, и их называют в соответствии с молекулярной массой, выраженной в килодальтонах, например БТШ70 или БТШ26 (hsp70 и hsp26).

О существенной роли БТШ в жизни клеток говорит их высокая консервативность в эволюции, например, отдельные участки в БТШ70 сохраняют свыше 90 % гомологии у бактерий и человека.

Синтез белков теплового шока — стрессовая программа, включаемая тепловым шоком или многочисленными другими стрессирующими факторами. Начинается быстрое перепрограммирование работы клетки.

БТШ представлены группой высокомолекулярных (60–110 кДа) и низкомолекулярных (15–35 кДа) белков. У дрожжей высокомолекулярные БТШ имеют массу 104 кДа, у млекопитающих — 90, у дрозофилы — 83 кДа.

В ответ на стресс особый полипептид массой 110 кДа, называемый фактором транскрипции при тепловом шоке (HSTF или HSF), связывается с регуляторной зоной генов теплового шока — элементом теплового шока HSE (см. рис. 7.43–7.46) и включает активную транскрипцию данных генов.

Гены БТШ экспрессируются не только под действием теплового шока, но многие и в ходе нормального развития.

Резкие изменения в синтезе и распределении белков теплового шока происходят после воздействия стрессирующими факторами: вновь синтезируемые белки очень быстро перемещаются в ядро и другие клеточные органеллы (рис. 13.26). Один из белков, БТШ70, присоединяется к другим белкам, вызывая их разворачивание и препятствуя агрегации, которая помешала бы белку приобрести нативную конформацию, необходимую для его функциональной активности. Разворачивание белков с помощью БТШ70 требуется для их проникновения через мембраны хлоропластов, митохондрий и эндоплазматического ретикулюма. Поскольку БТШ70 влияет на конформационное состояние других белков, его относят к группе шаперонов — белков, стабилизирующих структуру других белков. Белок БТШ70 присутствует во всех компартментах клетки (см. рис. 13.26).

Таким образом, исследование теплового шока представляет большой общебиологический интерес по следующим причинам:

Рисунок 13.26

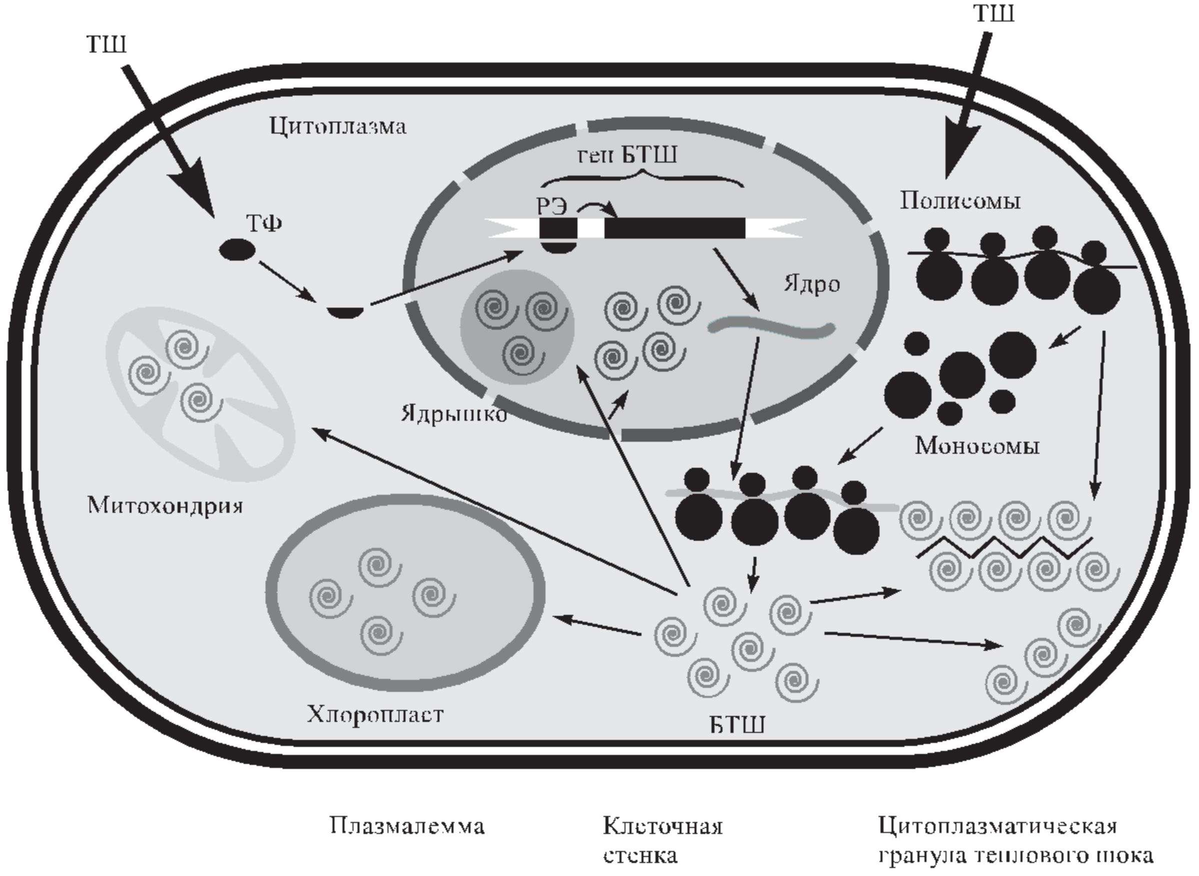


Схема индукции синтеза и распространения в клетке белков теплового шока [Кулаева, 1997]: ТФ — фактор теплового шока; РЭ — регуляторный элемент гена

1) процесс активирования генов БТШ является замечательной моделью для выяснения механизмов индукции экспрессии генов;

2) изучение БТШ позволяет исследовать молекулярные основы устойчивости клеток к стрессу;

3) изучение БТШ дало толчок исследованию особой функции белков — молекулярной защиты других белков.

Литература к разделу 13.10

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 315–354.

Кулаева О. Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журн. 1997. № 2. С. 5–13.

Лозовская Е. Р., Левин А. В., Евгеньев М. Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // Генетика. 1982. Т. 18. С. 1749–1762.

Хлебодарова Т. М. Как клетки защищаются от стресса? // Генетика. 2001 (в печати).

Ashburner M., Bonner J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock // Cell. 1979. Vol. 17. P. 316–395.

Georgopoulos C., Welch W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones // Annu. Rev. Cell Biol. 1993. Vol. 9. P. 901–934.

Heat shock, from bacteria to man / M. J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres (eds). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 440 p.

Mayer M. P., Bukau B. Molecular chaperones: the busy life of *hsp90* // Current Biol. 1999. Vol. 9. P. R322–R325.

Morimoto R. I. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes // Science. 1993. Vol. 259. P. 1409–1410.

Morimoto R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // Genes Developm. 1998. Vol. 12. P. 3788–3796.

Nover L., Hellmund D., Neumann D. et al. The heat shock response of eukaryotic cells // Biol. Zbl. 1984. Vol. 103. P. 357–435.

13.11. КОЛЬЦА БАЛЬБИАНИ

Кольца Бальбиани — это пуфы, имеющие особую морфологию: хроматиды при активировании выпрямляются и образуют петли. Множество петель в свою очередь образуют муфтообразную структуру, которая и называется кольцом Бальбиани (КБ) (рис. 13.27).

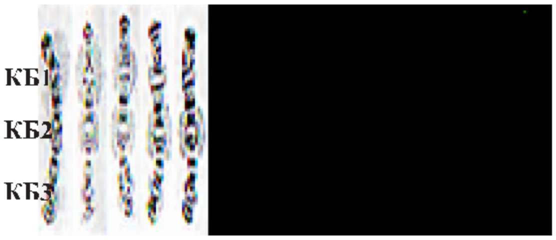
В КБ хирономусов закодирован особый белок секрета слюнной железы. В клетках, не связанных с пищеварительными функциями, КБ отсутствуют. Размер белкового продукта составляет около 10^3 кДа.

В кольцах Бальбиани исключительно высокий уровень транскрипции: плотность посадки молекул РНК-полимеразы II составляет 120 молекул на ген. С гена считывается высокомолекулярная РНК с константой седиментации 75S. Она упаковывается в крупные гранулы диаметром 30–60 нм и в таком виде переносится в цитоплазму.

У хирономид известно по нескольку (около четырех) генов, которые при активировании формируют КБ. Эти гены устроены своеобразно: во-первых, они имеют гигантские размеры — около 37 тпн, во-вторых, существенная часть генов (15–25 тпн) состоит из повторенных последовательностей (рис. 13.28).

В клетках, где КБ неактивны, в промоторной области генов КБ выявлены четко позиционированные нуклеосомы в положении от –600 до +200.

Рисунок 13.27



Последовательное изменение активности трех колец Бальбиани (КБ1–КБ3) у *Chironomus tentans* [Beermann, 1973. — Из: Zhimulev, 1999. P. 392]

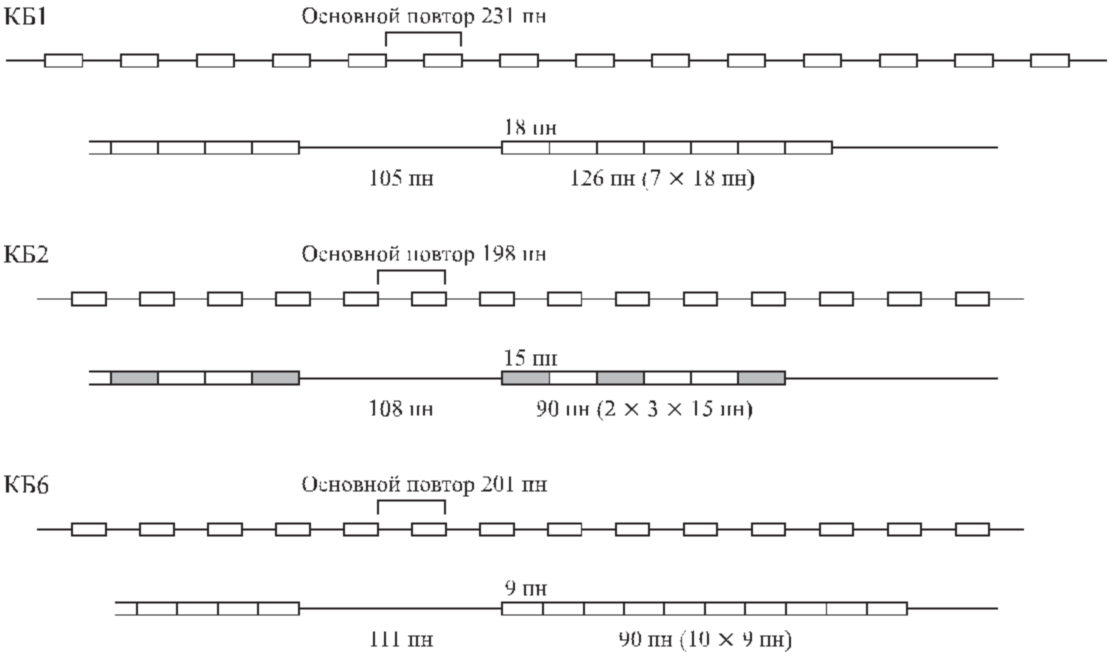
Литература к разделу 13.11

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 362–381.

Belikov S., Paulsson G., Wieslander L. Promoter regions of four Balbiani ring genes in *Chironomus tentans* exhibit a common salivary gland-specific chromatin organization, which is independent of the rate of transcriptional initiation // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 258. P. 420–426.

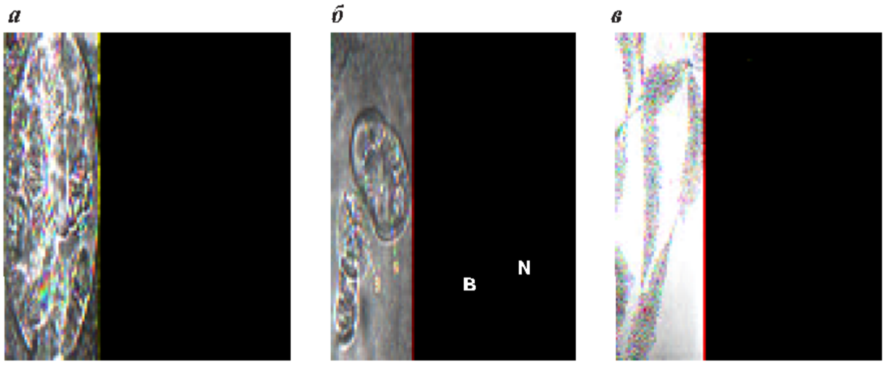
Zhimulev I. F. Genetic organization of polytene chromosomes // Advances in Genetics. 1999. Vol. 39. P. 387–407.

Рисунок 13.28



Структура фрагментов генов КБ1–КБ6 у *Chironomus pallidivittatus* [Galler et al., 1984. — Из: Zhimulev, 1999. P. 400]

Рисунок 13.29



Ядрышки в клетках с политенными хромосомами (*а*, *б*) и ядрышковый материал, распластанный на поверхности воды (*в*) [Жимулёв, 1994. С. 384, 393]

13.12. ЯДРЫШКИ

Ядрышки как особые органеллы ядра в клетках с политенными хромосомами были описаны одновременно с открытием политенных хромосом, т. е. в 1881 г. (рис. 13.29, *а*, *б*). К середине 1930-х гг. стало ясно, что формирование ядрышек связано с определенным участком хромосомы. В 1965 г. Ф. Ритосса и С. Спигелмэн установили, что ядрышко является участком хромосомы, называемым ядрышковым организатором, в котором транскрибируются гены рибосомных 18S РНК и 28S РНК (см. рис. 7.75). Число генов рРНК в геноме у разных видов варьирует от 30 до 700. В 1969 г. О. Миллером и Б. Битти была разработана методика распластывания ядрышек на поверхности воды, в результате чего выявляются характерные структуры, напоминающие елочку (рис. 13.29, *в*). На нити, представляющей собой хроматиду, расположен рибонуклеопротеиновый «матрикс» — молекулы транскрипционного комплекса и растущая молекула РНК. Публикация этих фотографий вызвала огромный интерес в прессе, и во многих журналах появились статьи, демонстрирующие эти «елочки» и озаглавленные «Портрет гена».

С одного гена единовременно считывается примерно 100 молекул РНК.

Каждый ген, входящий в ядрышковый организатор, функционирует независимо от других. Если один из генов встроить в транспозон и ввести его в геном с помощью трансформации, в месте встройки транспозона формируется небольшое ядрышко.

Делеции части ядрышкового организатора у дрозофилы вызывают мутации *bobbed*. Через некоторое время число повторов у мутантов восстанавливается до нормы. Этот процесс, называемый магнификацией, открыл Ф. Ритосса в 1968 г.

Ядрышковые гены подвержены также амплификации — размножению числа копий рДНК, расположенных вне хромосом. Амплификация была открыта в ооцитах амфибий в 1968 г. Дж. Голлом, Д. Брауном и И. Давидом.

Литература к разделу 13.12

Беляева Е. С. Структура и функционирование ядрышка // Цитология. 1971. Т. 13, № 6. С. 733–744.

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 382–398.

Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. С. 157–351.

13.13. ДНК-ПУФЫ

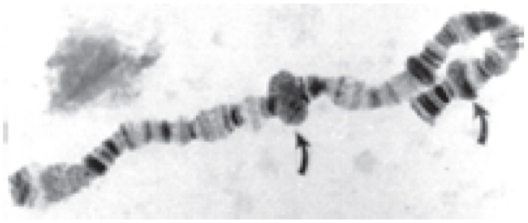
В 1954 г. бразильские ученые К. Паван и М. Бройер установили, что у насекомых из семейства Sciaridae в некоторых пуфах в ходе их развития происходит амплификация ДНК. В результате декомпактизации и, следовательно, уменьшения концентрации ДНК в объеме пуфа обычные РНК-пуфы теряют окрашиваемость и выглядят на препаратах светлыми и прозрачными. Напротив, ДНК-пуфы остаются темноокрашенными из-за накопления дополнитель-

ной ДНК (рис. 13.30) Такие ДНК-пуфы возникают только в слюнных железах на поздних стадиях развития. Они кодируют белки секреции слюнных желез.

Одновременно с амплификацией ДНК в пуфах этого типа происходит активная транскрипция.

В результате клонирования и анализа ДНК-пуфов установлено, что в ходе амплификации в хромосомах происходит примерно 20-кратное увеличение числа матриц генов, с которых затем считывается мРНК.

Рисунок 13.30



ДНК-пуфы в политенных хромосомах *Sciara coprophila* (указаны стрелками) [Cannon, 1965. — Из: Жимулёв, 1994. С. 308]

Литература к разделу 13.13

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 306–315.

Abstracts of the VIII International Balbiani Ring Workshop, August 30 — September 3, 1997, Falsterbo, Sweden // Hereditas. 1997. Vol. 127. P. 265–286.

13.14. ПРИЦЕНТРОМЕРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ

В политенных хромосомах, так же как и в митотических, гетерохроматин расположен в прицентромерных районах. Однако, поскольку политенные хромосомы в клеточных делениях не участвуют, положение центромеры у них иногда определить довольно трудно. Можно выделить три различные ситуации:

1. В прицентромерных областях обнаружены довольно крупные блоки гетерохроматина, которые объединяются в узел, называемый хромоцентром (см. рис. 13.2, 13.3).

2. В прицентромерных участках выявляются большие (у видов *Glyptotendipes* попросту огромные) блоки материала, обладающего характерными признаками гетерохроматина, т. е. повышенной компактностью, окрашиваемостью, поздней репликацией ДНК, наличием повторенных последовательностей (см. разд. 9.5). Хромоцентр не образуется, и хромосомы расположены отдельно друг от друга (см. рис. 13.3).

3. Довольно часто бывает, что в околоцентромерных районах ничего особенного нет, там расположены обычные диски. Естественно, что хромоцентр в этих случаях также не образуется, и выявить положение центромеры и прицентромерного гетерохроматина довольно сложно.

Дрозофилы — это организмы, у которых много гетерохроматина, обычно объединенного в хромоцентр. Хромоцентр образуется за счет конъюгации прицентромерных районов всех хромосом. Такую конъюгацию раньше называли «негомологичной» (поскольку конъюгировали районы разных хромосом) или эктопической. Э. Хайц в 1934 г. обнаружил в составе хромоцентра две субстанции (рис. 13.31): плотные компактизованные гранулы, которые он назвал α-гетерохроматином, и рыхлое сетчатое образование — β-гетерохроматин.

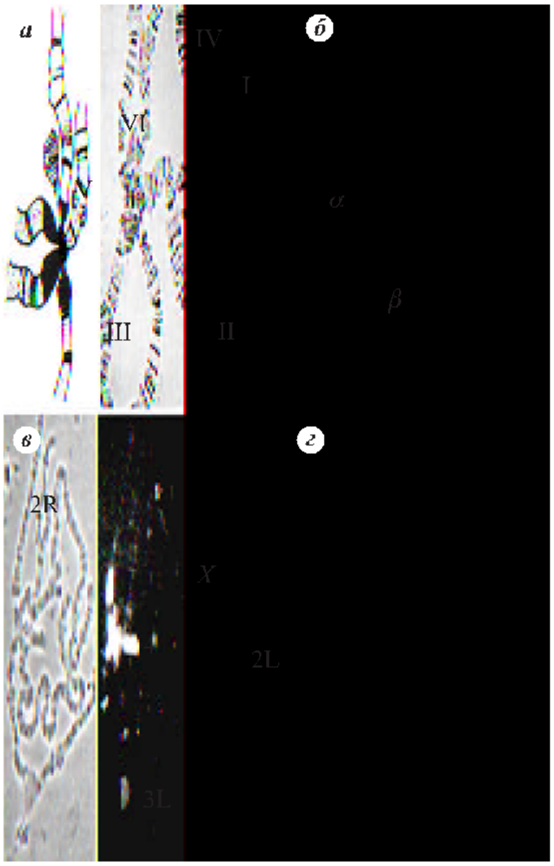
Молекулярная структура ДНК гетерохроматина подробно рассмотрена в разд. 9.5, здесь можно привести данные об особенностях, выявляемых только в политенных хромосомах. Полагают, что в α-гетерохроматине располагаются главным образом сателлитные ДНК, в β-гетерохроматине — различные мобильные элементы.

При выделении и анализе ДНК оказалось, что блоки сателлитных повторов перемежаются блоками умеренных, представленных мобильными элементами. Блоки умеренных повторов выглядят как острова в безбрежном океане сателлитов. Поэтому блокам умеренных повторов дали названия островов Тихого океана — Таити, Бора-Бора и др. Есть в гетерохроматине и уникальные последовательности.

α-Гетерохроматин образуется в результате объединения соответствующих участков всех хромосом (рис. 13.32). Деление на α- и β-гетерохроматин не абсолютно. В 1996 г. Д. Е. Коряков и его коллеги показали, что участок α-гетерохроматина в одной ткани может стать участком β-гетерохроматина в другой.

В зоне перехода между эухроматином и β-гетерохроматином у *Drosophila melanogaster* обнаружен особый повтор *Su(f)*, единица которого имеет длину около 800 пн. Внутри этого фрагмента пять раз встречаются мотивы CCCG или GGGC. Зона перехода протяженная, она

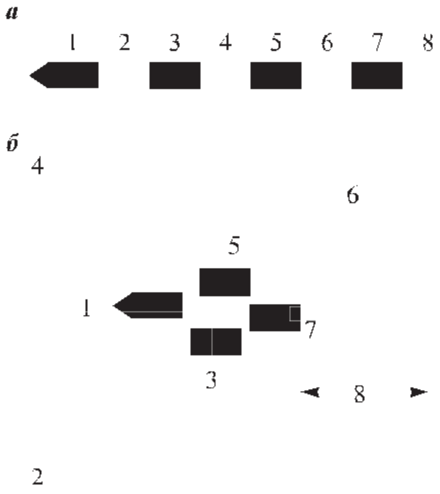
Рисунок 13.31



Прицентромерный гетерохроматин, объединенный в хромоцентр в политенных хромосомах *Drosophila virilis* (*а*, *б*) и *Drosophila melanogaster* (*в*, *г*):

а, *б* — морфология α- и β-гетерохроматина; *в* — фазовоконтрастная, *г* — иммунофлуоресцентная фотографии, демонстрирующие локализацию белка HP1. Рисунки взяты из работ: *а* — Heitz, 1934; *б* — Gall et al., 1971; *в*, *г* — James et al., 1988. — Из: Zhimulev, 1998. P. 92, 107

Рисунок 13.32



Организация гетерохроматина в митотической (*а*) и политенной (*б*) хромосоме [Koryakov et al., 1996].

Гетерохроматиновые сегменты (1–8) обладают различной представленностью в политенных хромосомах. Фрагменты 1, 3, 5, 7 составляют α-гетерохроматин, фрагменты 2, 4, 6 — β-гетерохроматин, фрагмент 8 — участок перехода между α-гетерохроматином и эухроматином

занимает миллионы пар нуклеотидов и обогащена *Su(f)*-повторами.

Белковые компоненты хромоцентра также специфичны: в нем выявляют белки, кодируемые генами *Su(var)3–7* и *Su(var)2–5*. Продуктом последнего гена является белок HP1 (см. рис. 13.31).

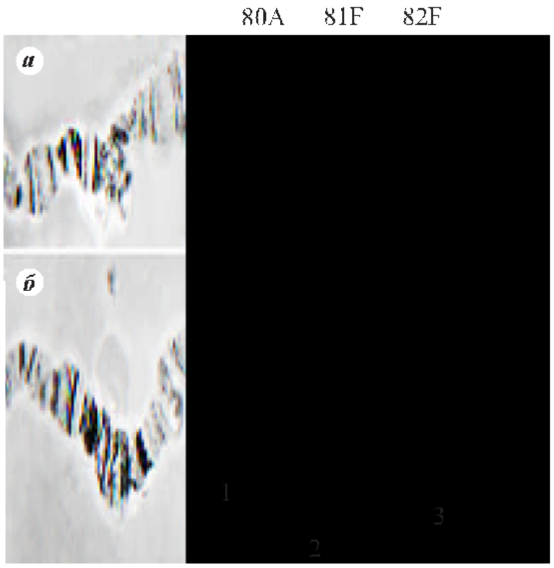
Одной из наиболее ярких особенностей ДНК в составе хромоцентров политенных хромосом является неполная их политенизация, или недорепликация. Обнаружена она была уже в первых работах на политенных хромосомах в результате сравнения долей эу- и гетерохроматина в митотических и политенных хромосомах у одного и того же вида. Например, у дрозофилы в митотической *X*-хромосоме гетерохроматин составляет около 40 % ее длины, в политенной *X*-хромосоме — не более нескольких процентов. В дальнейшем существование недорепликации получило многочисленные экспериментальные подтверждения.

α-Гетерохроматин почти не политенизируется, поэтому гранулы его очень невелики, их размеры обычно соответствуют размерам гетерохроматина, наблюдаемого в диплоидных митотических хромосомах. β-Гетерохроматин политенизируется в большей степени (см. рис. 13.32). И наконец, уникальные последовательности представлены в политенных хромосомах в той же степени, что и эухроматин.

Степень политенизации прицентромерного гетерохроматина находится под контролем по крайней мере двух факторов — тканевого и генетического. Нахождение политенных хромосом наряду с клетками слюнных желез в других органах показало, что участки гетерохроматина в разных типах клеток различаются по морфологии и размерам.

Особенно удивительным оказалось действие обнаруженного в 1998 г. Е. С. Беляевой гена *SuUR* (супрессор недорепликации) у дрозофилы. У гомозигот по мутантному аллелю происходит супрессия недорепликации гетерохроматина, т. е. некоторые его районы, прежде не политенизированные, начинают проходить

Рисунок 13.33



Участок прицентромерного β-гетерохроматина третьей хромосомы *Drosophila melanogaster* в линиях дикого типа (*а*) и у мутантов *SuUR* (*б*), у которых в прицентромерной области возникает участок хромосомы, обладающий рисунком дисков и названный авторами Атлантидой [Belyaeva et al., 1998]

все циклы репликации, и из них формируются типичные участки политенных хромосом с дисковым рисунком (рис. 13.33).

Литература к разделу 13.14

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 78-115.

Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.

Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Volkova E. V. et al. *Su(UR)ES*: a gene supressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1998. Vol. 95. P. 7532–7537.

Dimitri P. Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster* // Genetica. 1997. Vol. 100. P. 85–93.

Hennig W. Heterochromatin // Chromosoma. 1999. Vol. 108. P. 1–9.

Koryakov D. E., Alekseyenko A. A., Zhimulev I. F. Dynamic organization of the β-heterochromatin in the *Drosophila melanogaster* polytene *X*-chromosome // Mol. Gen. Genet. 1999. Vol. 260. P. 503–506.

Koryakov D. E., Belyaeva E. S., Alekseyenko A. A., Zhimulev I. F. Alpha and beta heterochromatin in polytene chromosome 2 of *Drosophila melanogaster* // Chromosoma. 1996. Vol. 105. P. 310–319.

13.15. ИНТЕРКАЛЯРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ

В политенных хромосомах, благодаря их максимальной декомпактизации, характерной для интерфазных хромосом, выявляется большое число деталей, в частности, обнаружены диски, имеющие сходство с прицентромерным гетерохроматином: эти участки хромосомы недореплицированы и поэтому рвутся (слабые точки), они вступают в эктопические контакты между собой и с прицентромерным гетерохроматином. В 1939 г. Б. Кауфман назвал эти районы интеркалярным гетерохроматином (ИГ). Позднее в них обнаружили ДНК, реплицирующуюся в поздней стадии S-периода. Оказалось, что они являются «горячими» точками образования хромосомных перестроек и локализации терминальных концов асинапсиса, т. е. они чаще находятся в состоянии гомологичной конъюгации. На рис. 13.34 видно, что высокая частота проявления различных признаков характерна для одних и тех же районов. Можно заметить и некоторые особенности: участков поздней репликации существенно больше, чем участков, где образуется слабая точка, т. е. не в каждом районе поздней репликации происходит недорепликация.

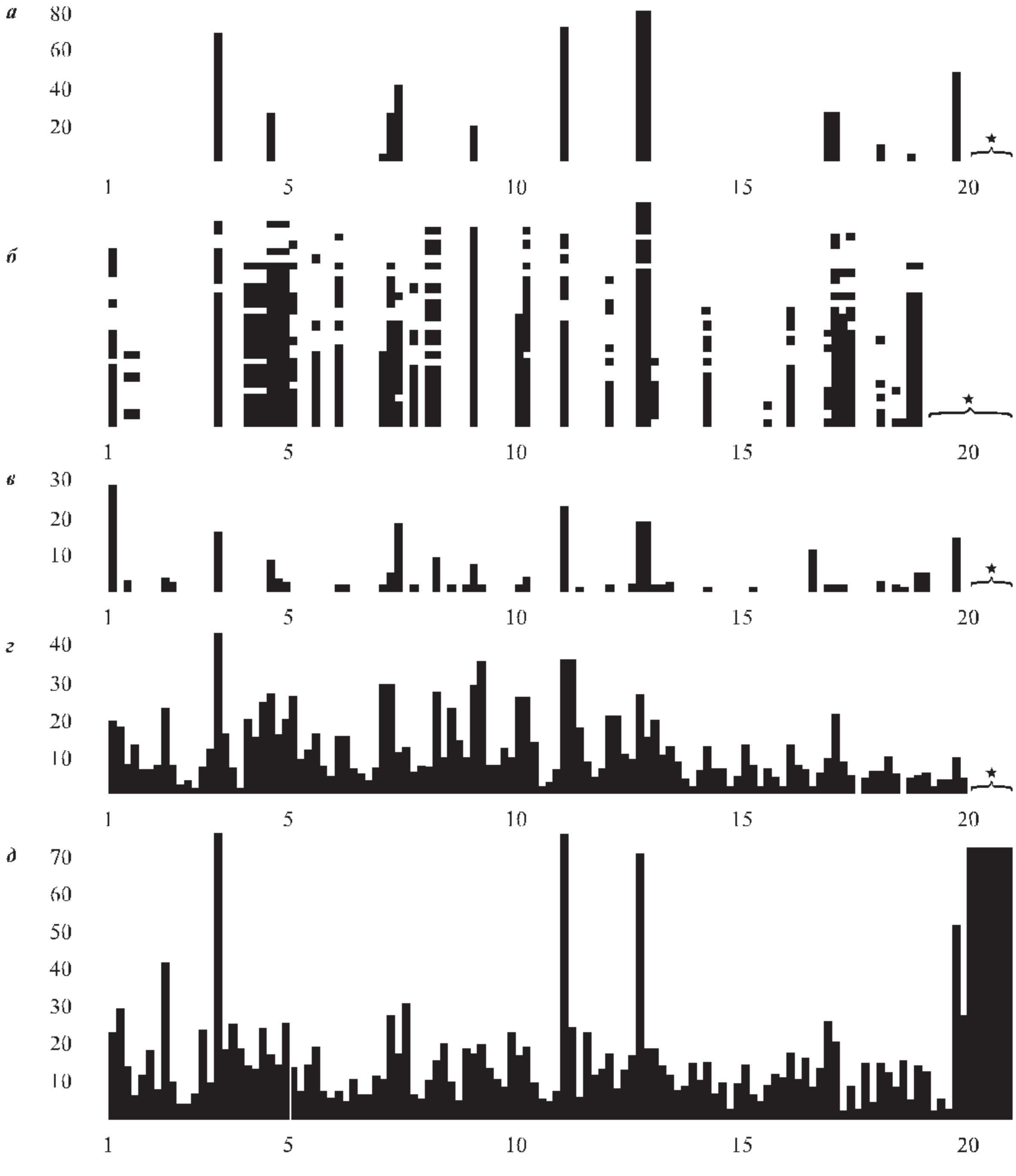
Районы ИГ — это диски из плотно компактизованного материала (рис. 13.35).

В двух изученных на данный момент дисках ИГ ДНК недореплицируется на большом протяжении: в районе 89E1–4 — около 300 тпн, в районе 11A6–9 — около 400 тпн.

Кривую недорепликации можно условно разделить на три участка (рис. 13.36): вначале на протяжении примерно 70 тпн она плавно опускается от 100 % политенизации до ~30 % (участок от –100 до –30 тпн), потом следует протяженный участок минимальной степени политенизации длиной около 150 тпн (от –30 до +120 тпн), затем около 70 тпн (от +120 до +190 тпн) — плавный подъем до 100 %. Зона максимальной недорепликации довольно хорошо соответствует локализации глубоко инактивированных, находящихся в состоянии сайленсинга, генов комплекса *BX-C* и локализации белков комплекса Polycomb, обеспечивающих сайленсинг, а также белков SuUR.

Проявления интеркалярного гетерохроматина, в первую очередь недорепликация, находятся под контролем различных факторов.

Рисунок 13.34

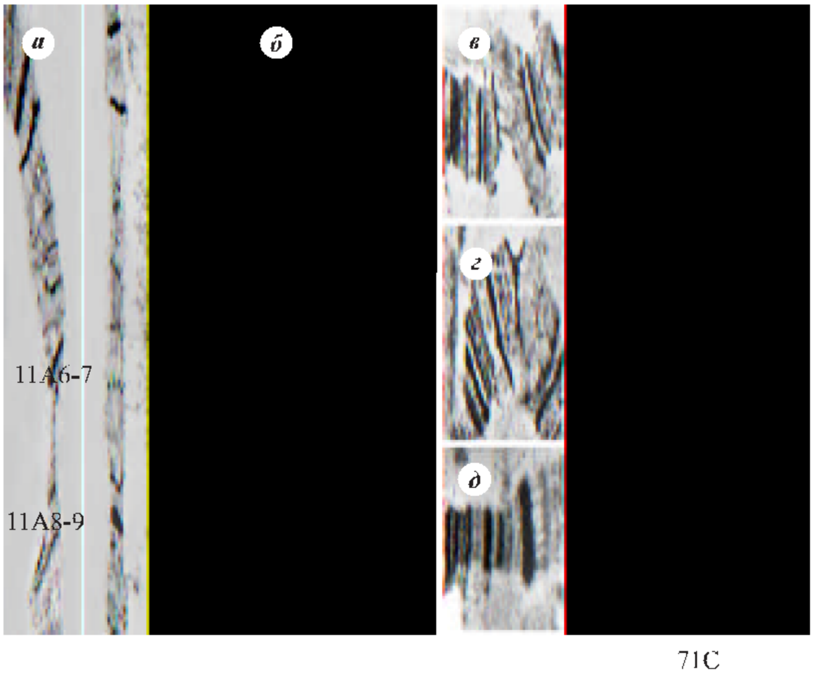


Частота проявления различных свойств ИГ в *X*-хромосоме дрозофилы:
а — слабые точки; *б* — поздняя репликация; *в* — участие района в поздней репликации; *г* — локализация участков завершения асинапсиса; *д* — частота нахождения точек разрывов хромосомных перестроек. Для районов, помеченных звездочкой, данные не получены

1. Факторы, возникающие в результате дифференцировки. У дрозофилы под действием мутации *otu* в питающих клетках ооцитов, т. е. в клетках зародышевого пути, формируются политенные хромосомы. Однако в них нет участков недорепликации: под микроскопом не выявляются слабые точки, а на Саузерн-блотах не обнаружена недопредставленность ДНК.

2. Модификаторы эффекта положения, такие как низкая температура или удаление *Y*-хро-

Рисунок 13.35



Электронно-микроскопические изображения дисков интеркалярного гетерохроматина у самок (*а*) и самцов (*б*) в районе 11А6–9 в хромосомах дикого типа, а также в районе 71С1–2 в хромосомах дикого типа (*в*, *г*) и у мутантов *SuUR* (*д*).
Фотографии любезно предоставлены В. Ф. Семешиным

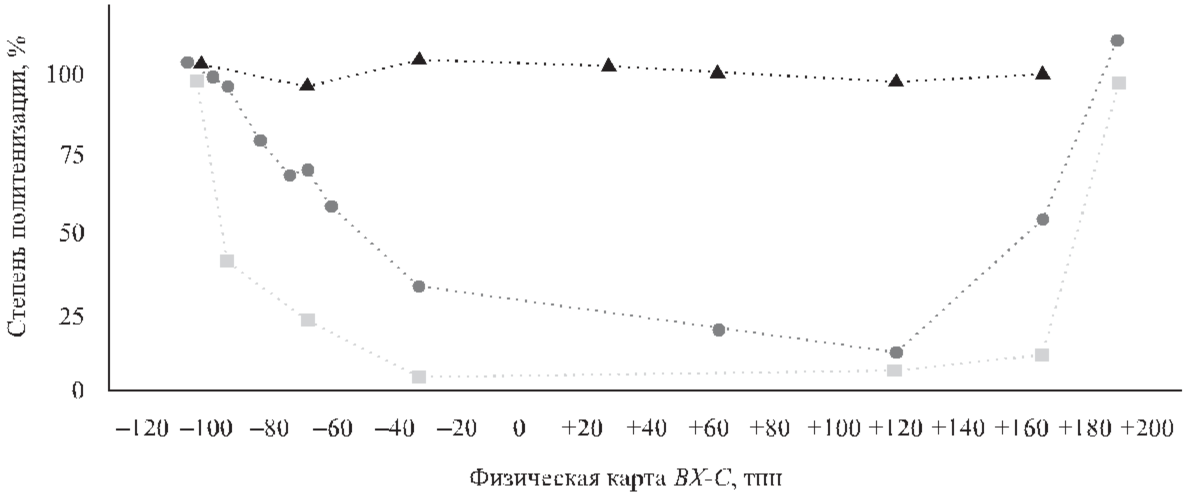
мосомы из генома (см. гл. 10), увеличивают частоту разрывов, а следовательно, и степень недорепликации.

3. Участки интеркалярного гетерохроматина, расположенные в *X*-хромосоме у дрозофилы, различаются по экспрессии у самок и самцов. В *X*-хромосомах самок недорепликация в ИГ происходит в той же степени, что и в ИГ аутосом. В *X*-хромосомах самцов недорепликация супрессирована (см. рис. 13.35, *а*, *б*), что объясняют процессом дозовой компенсации (см. разд. 14.7.1), когда в результате действия генов группы *msl* происходит разрыхление хроматина. В специальных экспериментах при использовании трансформации генов, влияющих на структуру хромосом, индуцировали дозовую компенсацию у самок, что приводило к супрессии недорепликации в ИГ *X*-хромосом у этого пола.

4. Ген *SuUR* оказывает уникальное модифицирующее действие на проявление недорепликации ИГ. Если уменьшить дозу этого гена (когда он находится в мутантном состоянии), недорепликация супрессируется и на месте разрывов формируются диски, очень крупные из-за того, что ДНК в них представлена полностью (см. рис. 13.35, 13.36). Если же увеличить дозу нормального гена $SuUR^{+}$ до четырех, например, введя с помощью трансформации два соответствующих транспозона, то происходит резкое усиление недорепликации ДНК. Зоны этой недорепликации четко очерчены. Во-первых, новые сайты недорепликации обнаруживаются только в районах, уже известных как позднореплицирующиеся. Во-вторых, недорепликация не выходит за пределы сайта ИГ, хотя число копий ДНК снижается, и в целом кривая становится резче (см. рис. 13.36).

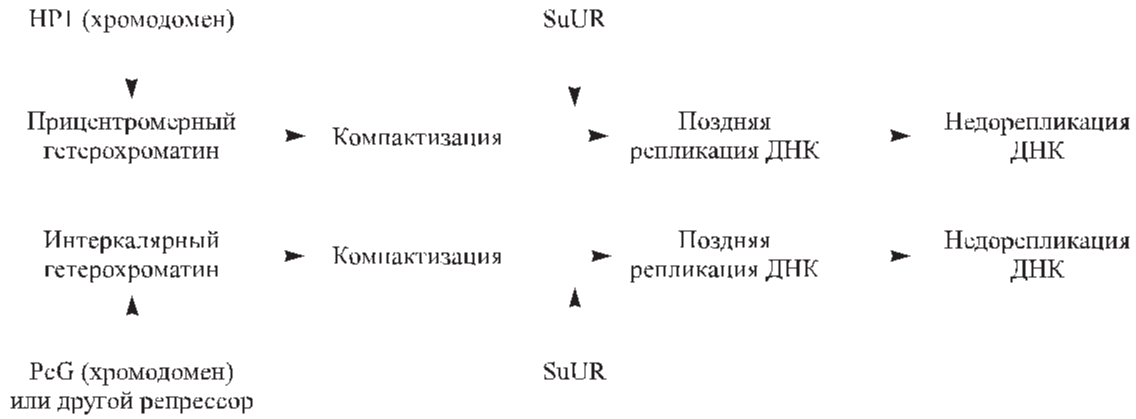
Между интеркалярным и прицентромерным гетерохроматином много общего не только в морфологических проявлениях (см. разд. 9.5). Есть и чисто функциональные черты сходства (рис. 13.37). Белковые комплексы сайленсинга, в которые входят такие белки, как Pc или HP1, связываются соответственно с интеркалярным и прицентромерным гетерохроматином, компактизуя хроматин, что приводит к инактивации транскрипции и репликации. В результате репликация районов сайленсинга происходит в поздней S-фазе. Продукт гена $SuUR^{+}$, хотя и не участвует в этих процессах, обусловливает какие-то дополнительные препятствия в репликации глубоко инактивированных районов, и данные районы недореплицируются.

Рисунок 13.36



Недорепликация ДНК в районе хромосомы, занимаемом генным комплексом *BX-C*, у дрозофилы.
Уровень политенизации (по отношению к участкам эухроматина) в хромосомах личинок дикого типа — кружки, у мутанта *SuUR* — треугольники, у личинок, содержащих четыре дозы гена *SuUR*+ — квадраты.
Данные любезно предоставлены А. А. Алексеенко

Рисунок 13.37



Параллелизм событий, приводящих к недорепликации ДНК
в прицентромерном и интеркалярном гетерохроматине

В отсутствие нормального продукта *SuUR*+ недорепликация супрессируется, в присутствии дополнительных нормальных доз этого гена уровень недорепликации возрастает и число недореплицирующихся районов увеличивается.

Литература к разделу 13.15

Жимулёв И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. С. 399–410.

Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. С. 115–206.

Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Volkova E. V. et al. *Su(UR)ES*: a gene supressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1998. Vol. 95. P. 7532–7537.

Moshkin Yu. M., Alekseyenko A. A., Semeshin V. F. et al. The *Bithorax Complex* of *Drosophila melanogaster*: underreplication and morphology in polytene chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2001. Vol. 98. P. 570–574.

13.16. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Политенные хромосомы на протяжении многих десятилетий в столетней истории генетики оставались уникальным объектом, с использованием которого были сделаны фундаментальные открытия. В начале 30-х гг. работы на политенных хромосомах дали решающее подтверждение хромосомной теории наследственности.

Как продемонстрировали в 1932 г. Дж. Паттерсон и в 1934–1935 гг. О. Маккензен, маленькие делеции можно успешно использовать для точного картирования генов (рис. 13.38).

С применением этого метода в 30-х гг. гены были прокартированы с очень большой точностью, вплоть до единственного диска и даже частей диска политенных хромосом. Сопоставление порядка локализации генов на генетической карте и в политенных хромосомах обнаружило их полную идентичность. К настоящему времени многие сотни генов дрозофилы точно прокартированы на картах политенных хромосом с помощью делеций.

В политенных хромосомах очень хорошо видны гетерозиготные инверсии (рис. 13.39). В 1936 г. Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов и Г. Г. Тиняков, а также А. Стёртевант и Ф. Добржанский начали использовать политенные хромосомы в исследованиях инверсионного полиморфизма и структуры популяций. В исследованиях, которые интенсивно проводятся многими лабораториями уже 65 лет.

Этот метод цитогенетического картирования в настоящее время дополняется методом гибридизации *in situ*, который позволяет локализовать гены с точностью до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов.

Использование политенных хромосом оказалось также решающим фактором в быстром развитии методов клонирования («ходьбы» и «прыжков»).

Крупный шаг в понимании организации и функции хромосом и генома в целом был сделан с развитием приемов микроклонирования, что позволяет выбирать район хромосомы, вырезать его с помощью микроманипулятора (рис. 13.40) и создавать библиотеку микроклонов из данного района политенной хромосомы. С помощью этого метода проклонирована существенная часть *X*-хромосомы и левого плеча второй хромосомы, созданы библиотеки клонов из прицентромерного гетерохроматина.

С использованием политенных хромосом было установлено, что гормоны влияют на развитие именно через активирование генов, что изменение активности генов под действием гормонов носит каскадный характер.

На политенных хромосомах было открыто общебиологическое явление ответа клеток на стресс, или синдром теплового шока. На политенных хромосомах были также открыты инсуляторы.

Литература к разделу 13.16

Жимулёв И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 306–308.

Painter T. S. Salivary chromosomes and the attack on the gene // Hereditas. 1934. Vol. 25. P. 465–476.

Рисунок 13.38

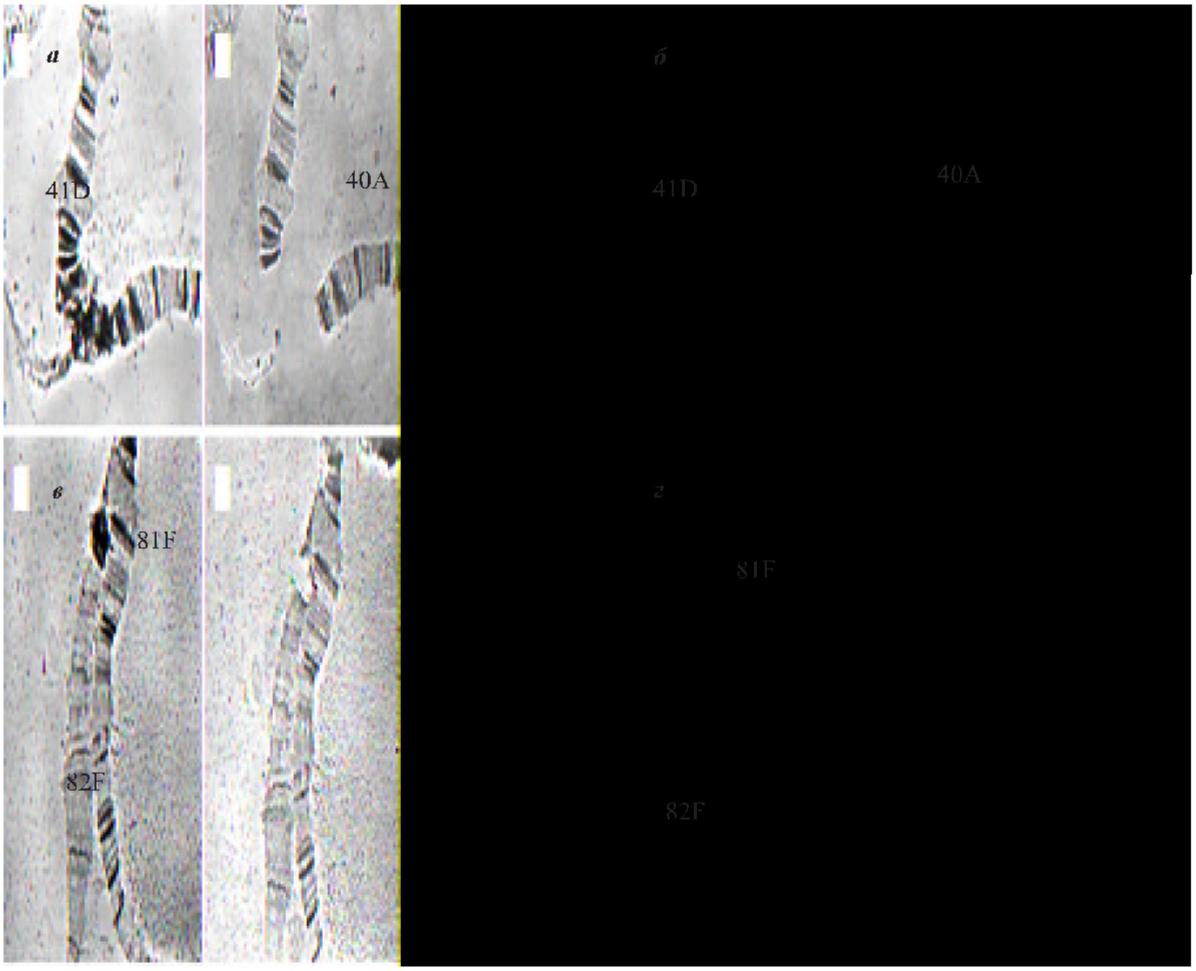
Гетерозиготная делеция в политенных хромосомах дрозофилы [Painter, 1934].

Показаны нормальный гомолог, образующий петлю, и гомолог с делецией

Рисунок 13.39

Первый рисунок гетерозиготной инверсии в *X*-хромосоме *Drosophila melanogaster* [Painter, 1934]

Рисунок 13.40



Фрагменты политенных хромосом дрозофилы, у которых с помощью микроманипулятора удален участок прицентромерного гетерохроматина 40A–41D (*а*, *б*) или гетерохроматиновый участок 81F (*в*, *г*): *а*, *в* — целые участки хромосом; *б*, *г* — то же после удаления участка гетерохроматина.
Из неопубликованной работы Н. Б. Рубцова с соавторами

Глава 14
ГЕНЕТИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА

14.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Давно замечено, что в потомстве фактически от любого скрещивания соотношение мужского и женского пола приближается к 1 : 1, т. е. в достаточно большой группе потомков на 100 самцов рождается 100 самок. Совершенно очевидно, что такое расщепление коррелирует с результатами особого генетического скрещивания — анализирующего, когда один из родителей гетерозиготен, другой — гомозиготен по анализируемому признаку. Поэтому *a priori* можно предположить, что один из полов как бы гетерозиготен, а другой гомозиготен по фактору, определяющему пол. Цитологический анализ выявляет наиболее заметное различие у полов — сочетание половых хромосом в кариотипе, причем один пол имеет одинаковые хромосомы, в кариотипе другого — две разные половые хромосомы, т. е. этот пол выглядит «гетерозиготным».

Привлекает внимание огромное разнообразие способов полового размножения и соответствующих им вариантов определения пола, затруднена даже их классификация.

Выделяют несколько типов определения пола в зависимости от числа и состава половых хромосом, например, у самца могут быть *X*- и *Y*-хромосомы, а у самки — *XX*. К такому типу относятся человек, дрозофила, водяной клоп *Ligaeus*, по имени которого и назван данный тип определения пола, а также многие другие виды животных.

Еще один тип, названный по имени другого водяного клопа *Protenor* и встречающийся у некоторых бабочек и червей, связан с наличием у самцов одной *X*-хромосомы (*X0*), а у самок — двух *X*-хромосом.

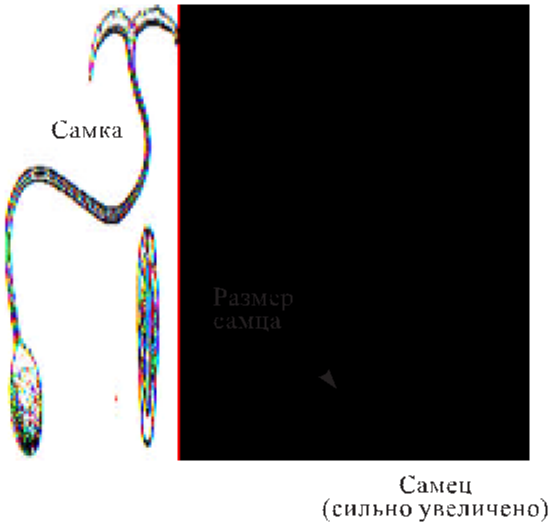
Иной тип хромосомного определения пола найден у птиц, некоторых бабочек, рыб, земноводных и цветковых растений. У них гетерогаметным (т. е. с разными половыми хромосомами) полом является женский, и самки имеют набор половых хромосом *ZW* или *Z0*, в то время как самцы — *ZZ*.

Известны и некоторые другие типы определения пола.

Совершенно очевидно, что в перечисленных выше случаях колоссальные и легко фиксируемые различия в организации и физиологии особей разных полов развиваются на фоне наборов генов, идентичных у самцов и самок и расположенных в хромосомах, не связанных с половыми различиями кариотипов, — аутосомах. И напротив, все половые различия определяются сравнительно небольшим числом генов, заключенных в половых хромосомах.

Возникает вопрос, каким образом число и состав половых хромосом могут определять развитие мужского или женского пола? Еще более интересно то, что, например, у дрозофилы в *Y*-хромосоме генов практически нет (к настоящему времени открыто только 11 генов, влияющих на формирование сперматозоидов; см. разд. 9.5). Более того, при потере *Y*-хромосомы особь *X0* также является самцом. А особь *XXY* — это нормальная плодовитая самка. Ка-

Рисунок 14.1



Внешние половые различия между самкой и самцом у морского червя *Bonellia viridis* [Дубинин, 1970. С. 121]

Таблица 14.1. Принципиальные схемы определения пола у некоторых живых организмов [Смирнов, 1997. С. 27]

Факторы, влияющие на развитие пола	*Saccharomyces cerevisiae*	*Caenorhabditis elegans*	*Drosophila melanogaster*	*Alligator mississippiensis*	Mammalia
Контролирующий сигнал	Транскрипция *HO*-гена	Соотношение *X*-хромосом и аутосом		Внешняя температура	*Y*-хромосома
Ключевой ген	*MAT* (*α*/a)	*her* (+/–)	*Sxl* (+/–)	*TDF*	*TDF–SRY*
Гены и их продукты, контролирующие гонадогенез (определяющие пол)	—	*xoll*, *sdc1*, *sdc2*, *herl*, *tra2*, *tra3*, *ferm1*, *ferm2*, *ferm3*, *tra1*	*sis-a*, *sis-b*, *da*, *liz*, *fl(2)d*, *Sxl*, *tra*, *tra2*, *dsx*, *ix*	Эффекторные молекулы, гормоны	Гормоны
Гены, контролирующие половую дифференцировку	Многие гены (+/–)				

Примечание. +/– означает альтернативу «включения» или «выключения» соответствующего гена.

ким же образом формируются самцы и самки у дрозофилы?

Различают дифференциацию пола (фенотипический пол), т. е. наличие внешних гениталиев, вторичных половых признаков, и первичное определение пола. Под первичным определением пола понимают появление гонады (репродуктивного органа соматической природы) самки или самца — яичника или тестиса. Считается, что принципиальная схема этого процесса консервативна. Существует конкретный контролирующий сигнал, включающий некий ключевой ген. Этот ген в свою очередь активирует некоторое число детерминант гонадогенеза и далее — факторов дифференцировки половых признаков. Все компоненты этой системы могут различаться у разных животных (табл. 14.1).

В некоторых случаях появление мужского или женского пола определяется не наследственными различиями, а влиянием условий среды. Классическим примером служит морской червь *Bonellia viridis*. Самцы размером в несколько миллиметров живут в матке самки, где выполняют свою задачу — оплодотворяют яйцеклетки. Самец является типичным паразитом, живущим внутри тела самки, размер которой примерно равен размеру сливы (рис. 14.1).

Личинки, развивающиеся после оплодотворения яйцеклеток, некоторое время ведут свободный образ жизни, а затем прикрепляются к хоботу половозрелой самки либо оседают и прикрепляются ко дну. Личинки этих двух типов ничем друг от друга не отличаются. Куда попадает данная личинка — дело случая. Однако в кого превращается личинка, т. е. будет ли она самцом или самкой, определяется условиями в период несвободной жизни личинки. Личинки, прикрепившиеся к хоботу самки, развиваются в самцов. Они проникают в женские половые органы и живут там как паразиты. Личинки, прикрепившиеся ко дну, становятся самками.

Определение пола у миссисипских крокодилов регулируется изменением внешней температуры [см. подробнее: Pieau, 1996].

Литература к разделу 14.1

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 101–135.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 110–124.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 386–394.

Дубинин Н. П. Генетика. Кишенев: Штиинца, 1985. С. 375–386.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 202–225.

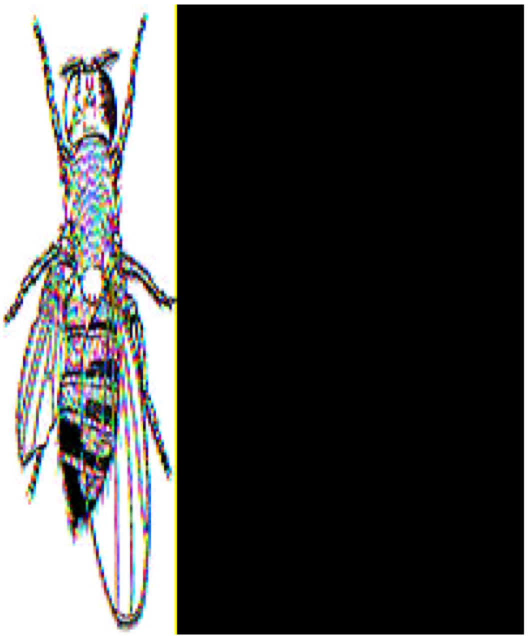
Смирнов А. Ф. Молекулярно-генетические механизмы первичной детерминации пола у млекопитающих // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 26–34.

Pieau C. Temperature variation and sex determination in reptiles // BioEssays. 1996. Vol. 18. P. 19–26.

14.2. ГИНАНДРОМОРФЫ, ИНТЕРСЕКСЫ, ГЕРМАФРОДИТЫ И ДРУГИЕ ПОЛОВЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ

У дрозофилы и у других организмов известны случаи гинандроморфизма, когда разные участки тела по своим признакам принадлежат разным полам. Организм выглядит как мозаик, у которого одна часть мужская, а другая — женская (рис. 14.2). В данном случае зигота имеет две *X*-хромосомы и должна бы развиться в самку. Она является гетерозиготой по рас-

Рисунок 14.2



Билатеральный гинандроморф *Drosophila melanogaster* [Дубинин, 1970. С. 386]

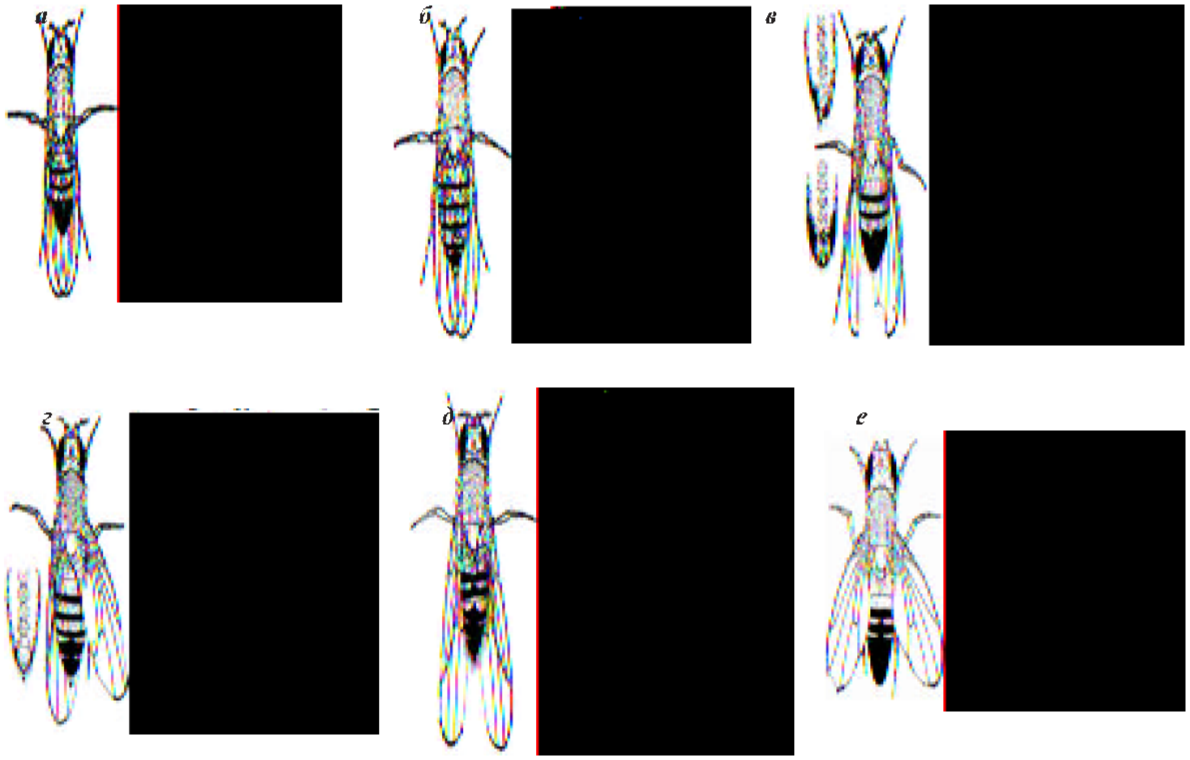
положенным в *X*-хромомсоме генам белоглазия и маленьких крыльев $wm/w^{+}m^{+}$. Во время первых делений дробления хромосома, несущая гены $w^{+}m^{+}$, утрачивается, и, если экватор митотического деления располагается по линии симметрии от головной до хвостовой части эмбриона, одна половина (левая на рисунке) тела мухи состоит из клеток только с одной *X*-хромосомой, что соответствует генотипу самца. Другая сторона имеет две *X*-хромосомы и развивается в самку.

Для непарного шелкопряда *Lymantria dispar* характерны резкие различия между самками и самцами. Скрещивание разных географических рас этой бабочки (европейских и японских) привело к появлению форм, переходных по своим признакам между самцами и самками, т. е. к появлению интерсексуальности. Интерсексы обнаружены и у дрозофилы.

От гинандроморфов интерсексы отличаются тем, что у них отсутствуют различно детерминированные по полу сектора (рис. 14.3).

У интерсексов до определенного момента развития сохраняется генетически детерминированный пол, но затем развитие продолжается в направлении противоположного пола.

Рисунок 14.3



Самец (*а*), самка (*б*) и некоторые ненормальные половые типы дрозофилы: интерсексы, развившиеся в сторону самца (*в*) и самки (*г*), сверхсамка (*д*), сверхсамец (*е*) [Bridges, 1922. — Из: Ashburner, 1989. P. 883–885]

В результате интерсексы отличаются от нормальных особей тем, что у них первичные и вторичные половые признаки носят промежуточный характер, образуя непрерывный ряд переходов от нормального самца к нормальной самке. Как описывал К. Бриджес, интерсексы у дрозофилы легко отличались от самцов и самок, были крупными мухами с грубыми щетинками, большими грубоватыми глазами и зазубренными краями крыльев. Половые гребешки (признак самца) присутствовали. Брюшко имело промежуточный характер между самцом и самкой. Наружные гениталии были сформированы преимущественно по типу самок. Гонады были представлены рудиментарными яичниками. Присутствовали и сперматеки. Нередко одна гонада была яичником, другая — семенником. Или же одна и та же гонада могла быть яичником с почкующимся на ней семенником [Bridges, 1921].

Наряду с разнополостью у многих растений и у низших животных встречается гермафродитизм, когда мужской и женский пол совмещаются в одном организме.

Литература к разделу 14.2

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 110–124.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 386–394.

Allen G. E. Thomas Hunt Morgan: the man and his science. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1978. P. 241–249.

Bridges C. B. Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster* // Science. 1921. Vol. 54, № 1394. P. 252–254.

14.3. БАЛАНСОВАЯ ТЕОРИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ДРОЗОФИЛЫ

В 1919 г. один из основоположников современной генетики К. Бриджес обнаружил несколько самок, имевших триплоидный набор хромосом, т. е. $3X + 3A$ — три набора X-хромосом и три набора аутосом. В результате скрещивания этих самок с нормальными самцами ($2A + XY$) в потомстве среди нормальных самок и самцов были обнаружены особи с промежуточным или необычным проявлением половых признаков. Все потомство распалось на 8 классов в зависимости от соотношения половых хромосом и аутосом:

1. $3X : 3A$ — триплоидная самка.
2. $2X : 2A$ — диплоидная самка.
3. $(2X + Y) : 2A$ — самка.

В этих трех случаях отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом составляет единицу. Наличие мужской Y-хромосомы не влияет на нормальное развитие самки.

4. Особи, имеющие хромосомную конституцию $XY : 2A$, т. е. у которых отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом составляет 0,5, — нормальные самцы.

Дополнение 14.1

В то время как К. Бриджес считал идею балансового определения пола неотразимой, Т. Морган никогда ее полностью не одобрял.

В письме О. Мору в 1923 г. Морган ясно выразил свой скептицизм: «Я полностью согласен с критикой балансовой теории, которую Бриджес так неумеренно любит. Она есть и будет оставаться выдумкой до тех пор, пока мы не сможем привлечь хоть какие-то объективные критерии для ее оценки. Она может оказаться, и, возможно, является истинной, однако она говорит нам не больше, чем сами полученные факты. В этом я убеждал Бриджеса с самого начала, но безрезультатно».

В своей книге «Теория гена» в 1926 г. Т. Морган объяснил идею Бриджеса очень коротко, на двух страницах, без какого-либо одобрения ее. Его возражения свелись к двум пунктам: во-первых, балансовая теория только пересказывала факты, т. е. перефразировала экспериментальные данные о корреляции между половыми фенотипами и отношениями числа X-хромосом и аутосом. Во-вторых, Морган не мог принять заключение Бриджеса о том, что большинство генов, необходимых для развития самца, были в аутосомах, а множество генов, определяющих формирование самок, расположены в X-хромосоме. Он писал: «То, что следует из данных на триплоидах, не дает какой-либо особой информации о наличии генов для определения пола. Если мы думаем о хромосомах только как об особых вместилищах генов, из этого следует, что такие гены существуют, но нет никаких свидетельств того, какие они. Если даже гены [в этот процесс] вовлечены, мы не можем судить о том, один ли ген, который влияет на развитие самки, расположен в X-хромосоме или там сотни таких генов. То же самое можно сказать и о генах во всех хромосомах, определяющих признаки самца. То ли они есть во всех хромосомах или только в одной паре хромосом». Морган также возражал цифровым аспектам теории Бриджеса [Allen, 1978. P. 245–246].

5–6. Интересными оказались особи $2X:3A$ и $(2X+Y):3A$, у которых отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом было промежуточным между 0,5 и 1. Они имели смешанное проявление мужских и женских половых признаков. Такие особи были интерсексами (см. рис. 14.3).

7–8. И наконец, если число наборов аутосом увеличивалось до трех при наличии одной X-хромосомы ($X:3A$), развивался «сверхсамец» — организм с гипертрофированными признаками самца, однако стерильный, слабый и быстро погибающий.

Напротив, увеличение числа X-хромосом при диплоидном наборе аутосом ($3X:2A$) ведет к формированию «сверхсамки» с ненормально развитыми яичниками и другими нарушениями признаков пола. Они, как и «сверхсамцы», слабые и быстро погибают.

К. Бриджес в 1925 г. пришел к выводу, что не присутствие двух X-хромосом определяет женский пол и не наличие Y-хромосомы определяет мужской пол у дрозофилы. Пол, по его мнению, определяется балансом числа X-хромосом и наборов аутосом, т. е. Y-хромосома у дрозофилы вообще не играет роли в определении пола.

Литература к разделу 14.3

Allen G. E. Thomas Hunt Morgan: the man and his science. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1978. P. 241–249.

Ashburner M. *Drosophila*: A laboratory handbook. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 883–885.

Bridges C. B. Sex in relation to chromosomes and genes // Amer. Naturalist. 1925. Vol. 59. P. 127–137.

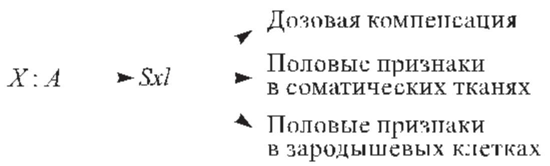
14.4. ДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОЛА У ДРОЗОФИЛЫ

Каким образом соотношение числа X-хромосом и аутосом, согласно балансовой теории Бриджеса, может определять развитие пола? В последние годы у дрозофилы открыты многочисленные гены, влияющие на формирование пола, среди них такие, как *Sxl* (sex lethal), *da* (daughterless), *sis* (sisterless), *tra* (transformer), *dsx* (double sex) и др.

Эксперименты показывают, что соотношение числа X-хромосом и аутосом каким-то образом улавливается геном *Sxl* на ранней стадии эмбрионального развития. Этот ген в свою очередь контролирует 3 различных направления дифференцировки пола: формирование половых признаков в соматических клетках и в клетках зародышевого пути, а также развитие дозовой компенсации (рис. 14.4). Каким образом это происходит?

На начальных этапах формирования пола у эмбрионов действуют гены *sis-a* и *sis-b*, расположенные в X-хромосоме, и ген *da*, расположенный в аутосоме. Белковые продукты этих генов образуют комплексную молекулу. Продукт гена *da* поступает в яйцеклетку из организма матери, его количество всегда соответствует двум дозам, так как он считывается с генов, локализованных в двух материнских аутосомах. Количество продуктов генов *sis-a* и *sis-b* зависит от того, сколько X-хромосом у эмбриона. В клетках эмбриона женского пола две X-хромосомы. С них считываются продукты генов *sis-a* и *sis-b* в двух дозах. У самцов только одна X-хромосома, которая на ранних стадиях развития в условиях нефункционирующего механизма дозовой компенсации производит только одну дозу продуктов этих генов. Поэтому в белковом комплексе sis/da соотношение составляющих его компонентов 1 : 2 у самцов и 1 : 1 у самок. Эти белковые продукты поступают к регуляторной зоне ключевого гена, определяющего пол, — *Sxl*. Эта зона включает 2 участка, стимулирующие транскрипцию РНК с данного гена: ранний и поздний промоторы P_E и P_L (рис. 14.5). Только в том случае если комплексный белок sis/da содержит 2 дозы sis, он может активировать транскрипцию с раннего промотора. Это происходит в самом раннем эмбриональном развитии, на стадии бластодермы. В дальнейшем транскрипция может начаться и с позднего промотора как у *XX*/*AA*, так и у *X*/*AA* особей. Но результаты включения транскрипции с каждого из этих промоторов будут разными. Рассмотрим их.

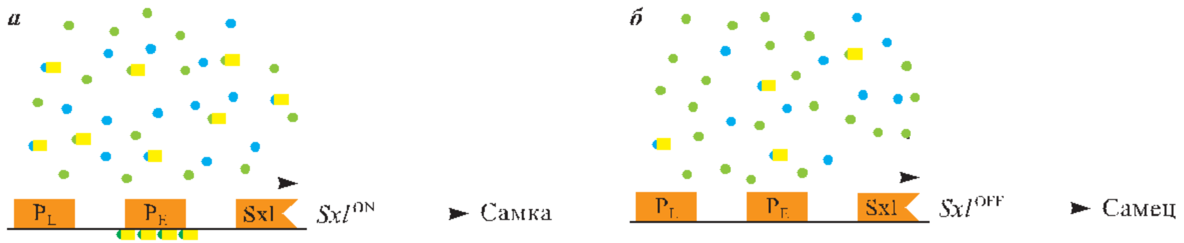
Рисунок 14.4



Схема, иллюстрирующая баланс хромосом, действие гена *Sxl* и развитие половых признаков [Nöthiger, 1992]

Ген *Sxl* содержит 8 участков, кодирующих последовательность аминокислот, — экзонов, разделенных некодирующими районами (рис. 14.6). У самцов ($X:A = 0{,}5$) при активировании позднего промотора P_L считывается

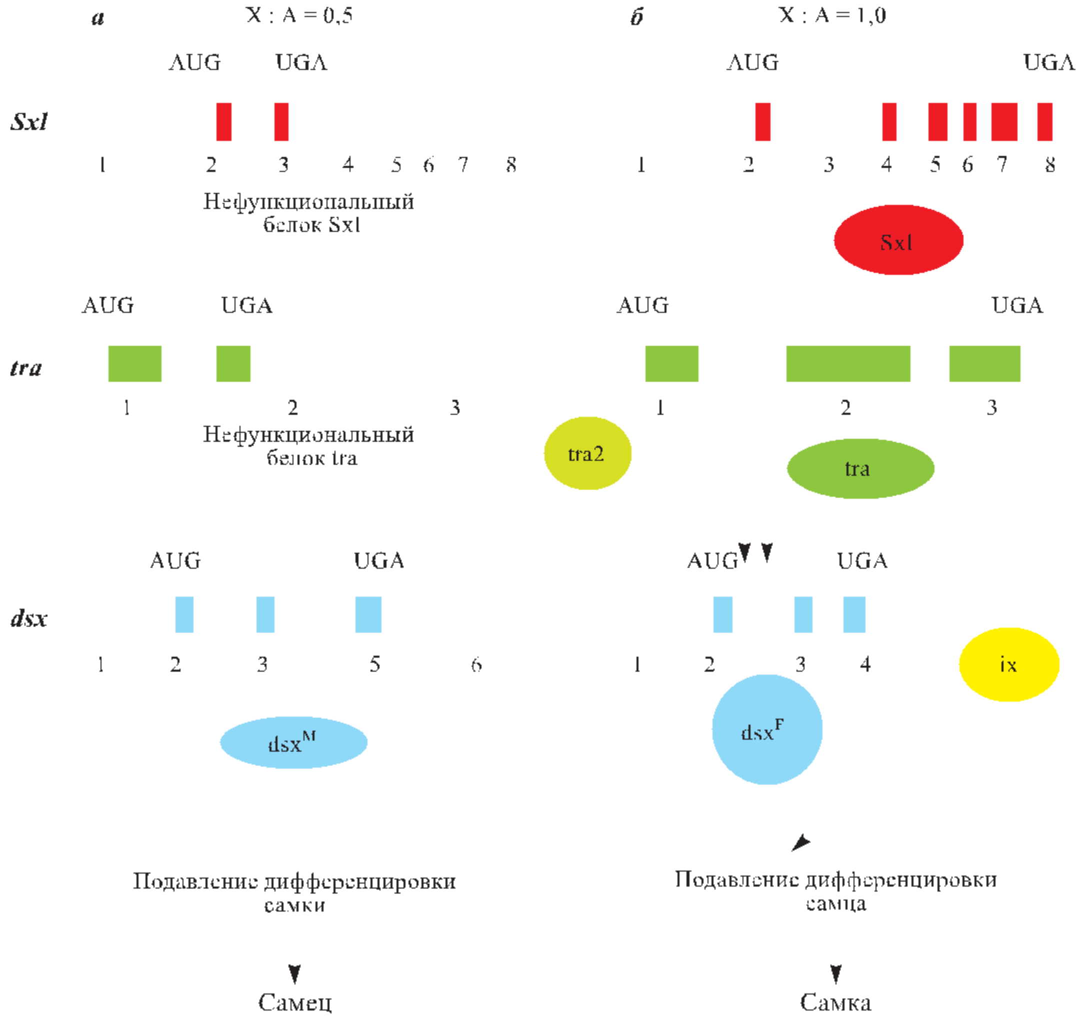
Рисунок 14.5



Модель механизма «включения» гена *Sxl* у разных полов [Belote, 1992].

У самок (*а*) и самцов (*б*) белки, кодируемые генами из *X*-хромосомы (прямоугольники), формируют активные комплексы с белками, кодируемыми генами, расположенными в аутосомах (кружки). Самки имеют в два раза больше комплексных молекул, чем самцы. Наличие большого числа этих молекул позволяет им связываться с P_E — промоторным элементом гена *Sxl* и активировать транскрипцию (стрелка вправо — Sxl^{ON}). У самцов число молекул комплекса недостаточно, чтобы активировать P_E. Ген *Sxl* не «включается» (Sxl^{OFF}), что и приводит в конечном счете к развитию половых признаков самца

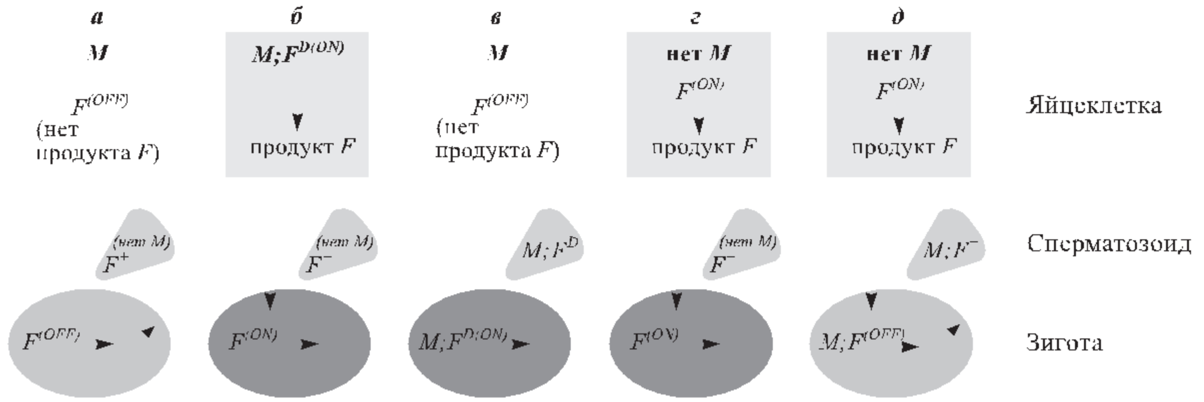
Рисунок 14.6



Каскад генных взаимодействий, приводящих к формированию соматических половых признаков самца (*а*) и самки (*б*) [Belote, 1992].

В каскад вовлечены гены *Sxl*, *tra*, *tra2*, *ix* и *dsx*. Прямоугольники с цифрами обозначают кодирующие части генов — экзоны. Закрашенные части экзонов представляют собой участки, кодирующие аминокислоты. Зигзагами показаны интроны

Рисунок 14.7



Схемы, объясняющие формирование самцов и самок у *Musca domestica* [Dübendorfer, Hediger, 1998]:
а — активностью гена *M* отключается ген *F* при созревании яйца, в отсутствие продукта гена *F* в яйцеклетке формируется самец; *б* — активностью гена F^D подавляется действие гена *M*, в результате чего в яйцеклетке появляется продукт гена *F*, развивается самка; *в* — в яйцеклетке нет продукта гена *F*, но в зиготу вносится ген F^D сперматозоидом, развивается самка; *г* — в отсутствие гена *M* в яйцеклетке и сперматозоиде для формирования самки достаточно гена F^+; *д* — в отсутствие F^D в яйцеклетке и сперматозоиде наличия одной дозы *M* в сперматозоиде достаточно для формирования самца

третий экзон (рис. 14.6, *а*), содержащий большое число кодонов UGA, после каждого из которых трансляция останавливается, и белок получается усеченным. В отсутствие нормального функционального белка гена *Sxl* ген *tra*, расположенный далее в данном каскаде, также функционирует неправильно, опять же давая короткую нефункциональную молекулу белка (трансляцию блокирует кодон UGA во втором экзоне). Хотя белок другого гена — *tra2* — присутствует у обоих полов, он не формируется до нормального состояния без функционального продукта гена *tra*. Более того, в отсутствие нормальных продуктов генов *tra* и *tra2* образуется особый (самцовый) белок dsx^M, считанный с определенного набора экзонов. Такой белок репрессирует развитие признаков женского пола. В результате нарушений в каскаде этих генов развитие направляется в сторону формирования признаков самца.

У самок ($X : A = 1$) транскрипт гена *Sxl* не содержит 3-го экзона со стоп-кодоном, в результате чего синтезируется полноценный белок Sxl, взаимодействующий с геном *tra*, который в комплексе с продуктом гена *tra2* регулирует образование специфической для самок РНК гена dsx^F (см. рис. 14.6, *б*). Наличие продукта dsx^F способствует вовлечению в данный каскад гена *ix*. Белки генов dsx^F и *ix* инактивируют многие гены, которые могли бы привести к формированию самцов, и в конечном итоге возникает самка.

По этой схеме формируются внешние (соматические) половые признаки.

Под четким генетическим контролем находится определение пола у комнатной мухи *Musca domestica*. *Y*-хромосома самца обычно несет фактор, детерменирующий пол самца, — M^Y, который и составляет первичный сигнал определения пола. Число *X*-хромосом на определение пола не влияет. У представителей других популяций этот фактор локализуется в одной из аутосом и даже в *X*-хромосоме. Это предполагает, что он является мобильным элементом. В линиях с аутосомной локализацией *M*-фактора *Y*-хромосома может быть утрачена, все особи несут только *X*-хромосомы, но при этом формируются самцы. И наконец, в линиях третьего типа самцы и самки являются гомозиготами по аутосомному *M*-фактору.

Каким же образом в линии с *M/M* формируются самки? Оказывается, это достигается действием доминантного аллеля гена *F*, расположенного в 4-й хромосоме. Аллель F^D оказывает эпистатическое действие на ген *M* и определяет развитие самки даже в присутствии одной или нескольких копий *M*-фактора. Нормальный аллель — F^+ негативно контролируется *M*-факторами. Таким образом, доминантный ген F^D стимулирует развитие самок, рецессивный F^+ — развитие самца. Современные представления о генетическом контроле пола у комнатных мух изображены на рис. 14.7.

Интересно, что последовательность ДНК, гомологичная гену *Sxl Drosophila melanogaster,* присутствует в геноме *Musca domestica*, однако этот ген экспрессируется как у самок, так и у самцов: в ходе развития обнаружены те же

самые транскрипты и изоформы белков у обоих полов.

У средиземноморской плодовой мушки *Ceratitis capitata* также присутствует ген, гомологичный гену *Sxl Drosophila melanogaster*. Однако и у этого вида данный ген экспрессируется у обоих полов.

Очевидно, что первичные сигналы, активирующие каскады генной активности, приводящие к развитию разных полов, сильно различаются у разных видов.

Литература к разделу 14.4

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 210–229.

Belote J. M. Sex determination in *Drosophila melanogaster*: from the X : A ratio to doublesex // Seminars in Devel. Biol. 1992. Vol. 3. P. 319–330.

Cline T. W., Meyer B. J. Vive la difference: males vs females in flies vs worms // Annual Rev. Genet. 1996. Vol. 30. P. 637–702.

Dübendorfer A., Hediger M. The female determining gene *F* of the housefly, *Musca domestica*, acts maternally to regulate its own zygotic activity // Genetics. 1998. Vol. 150. P. 221–226.

Graves J. A. M. The origin and function of the mammalian *Y* chromosome and *Y*-borne genes — an evolving understanding // BioEssays. 1995. Vol. 17. P. 311–321.

Hediger M. et al. The male-determining activity on the *Y* chromosome of the house fly (*Musca domestica* L.) consists of separable elements // Genetics. 1998. Vol. 150. P. 651–661.

Meise M. et.al. *Sex-lethal,* the master sex-determining gene in *Drosophila,* is not sex-specifically regulated in *Musca domestica //* Development. 1998. Vol. 125. P. 1487–1494.

Nöthiger R. Genetic control of sexual development in *Drosophila //* Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1992. Vol. 85. P. 177–183.

Saccone G. et al. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated // Development. 1998. Vol. 125. P. 1495–1500.

14.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

При определении пола у млекопитающих решающую роль играет *Y*-хромосома. Известно, что сочетания половых хромосом *XX* и *XY* приводят к образованию нормальных женской и мужской особей соответственно. Однако в отсутствие *Y*-хромосомы формируется особь женского пола при любом числе *X*-хромосом. Особь *X0* развивается главным образом по женскому типу, но имеет ряд отличий от нормы, известных как синдром Шерешевского–Тернера. При наличии трех или даже четырех *X*-хромосом, но в присутствии *Y*-хромосомы формируется мужской тип тела, правда, тоже с отклонениями, известными как синдром Клайнфельтера (см. дополнение 4.3).

Уже в самых первых актах детерминации гонад у самцов млекопитающих необходима активность *Y*-хромосомы, точнее, сцепленного с ней тестис-определяющего фактора (*testis-determining factor — TDF*). Этот фактор был идентифицирован при анализе транслокаций небольших фрагментов *Y*-хромосомы на *X*-хромосому, в результате чего формировались особи с инверсией пола — самцы *XX* и самки *XY*. Такие отклонения встречались у отдельных особей — представителей 17 семейств. Инвертированные самцы мышей XX^{Sxr} в *X*-хромосомах имеют перенесенные из *Y*-хромосомы небольшие фрагменты. Они обладают тестисами, но их репродуктивная система дефектна из-за аномалий сперматогенеза.

В 1990 г. у было установлено, что у человека фактор *TDF* — это не что иное, как ген *SRY* (sex determining region *Y* gene), который располагается в коротком плече *Y*-хромосомы во фрагменте длиной 35 тпн.

Ген *SRY* содержит консервативный домен (HMG), кодирующий фрагмент белковой молекулы размером 80 аминокислотных остатков. Этот продукт специфически связывается с ДНК, приводя к изгибанию ее молекулы. Такая деформация ДНК, индуцируемая SRY-белком или родственными ему молекулами (известно более 100 белков с HMG-доменом), может механически передаваться на достаточно большое расстояние и играть важную роль в регуляции транскрипции, репликации и рекомбинации.

Только HMG-домен является консервативной частью гена *SRY*. За пределами этой последовательности обнаружены существенные различия между гомологичными генами даже у близких видов. Например, у человека этот ген имеет небольшую длину, не содержит интронов и кодирует белок размером в 204 аминокислотных остатка. Его гомолог, выделенный из генома мыши, состоит уже из 395 аминокислот.

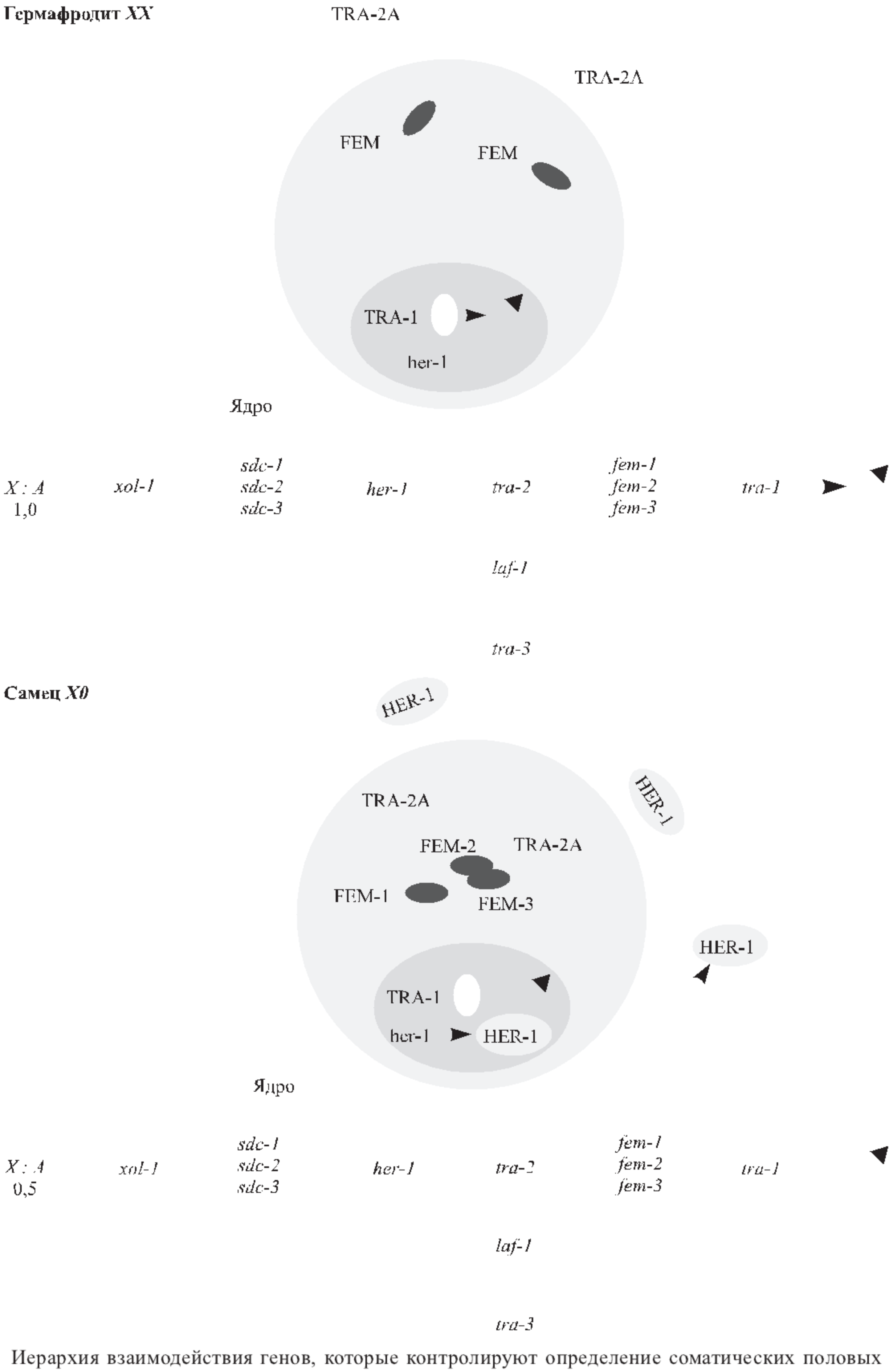
Кроме гена *SRY Y*-хромосома включает другие гены, необходимые для сперматогенеза.

Литература к разделу 14.5

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 210–229.

Смирнов А. Ф. Молекулярно-генетические механизмы первичной детерминации пола у млекопитающих // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 26–34.

Рисунок 14.8



Иерархия взаимодействия генов, которые контролируют определение соматических половых признаков и дифференцировку у гермафродитов и самцов *C. elegans* [Meyer, 1997. P. 220]

14.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

У этого вида нематоды два пола: самцы *X0* и гермафродиты *XX*. Гермафродиты в данном случае — это самофертильные самки, у которых признак самцовости заключается лишь в образовании ограниченного числа сперматозоидов, используемых исключительно для внутреннего самооплодотворения.

Самцы образуются в результате очень редкого спонтанного нерасхождения *X*-хромосом во время размножения гермафродитов или в результате расщепления при скрещивании самцов с гермафродитами. Пол определяется балансом числа *X*-хромосом и аутосом. Черви с соотношением $X:A = 0{,}75–1{,}0$ являются гермафродитами; особи, имеющие баланс $X:A = 0{,}5–0{,}67$, — самцы.

Мишенью, воспринимающей сигнал от соотношения $X:A$, является самцово-специфический ген *xol-1* (*X0 lethal*), который контролирует как детерминацию пола, так и дозовую компенсацию. У самцов уменьшение дозы *X*-хромосом приводит к более высокому уровню транскрипции этого гена, а у гермафродитов увеличение дозы — к более низкому уровню. Нулевые аллели гена *xol-1* не влияют на формирование нормальной морфологии гермафродитов *XX*, но они обусловливают феминизацию и гибель особей *X0*.

На рис. 14.8 представлена схема взаимодействия генов, индуцируемых геном *xol-1*, и формирования фенотипов самцов и гермафродитов.

Литература к разделу 14.6

Смирнов А. Ф. Молекулярно-генетические механизмы первичной детерминации пола у млекопитающих // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 26–34.

Meyer B. J. Sex determination and *X* chromosome dosage compensation // *C. elegans*. Vol. 2 / Ed. by D. L. Riddle et al. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. P. 209–240.

Cline T. W., Meyer B. J. Vive la difference: males vs females in flies vs worms // Annual Rev. Genet. 1996. Vol. 30. P. 637–702.

14.7. КОМПЕНСАЦИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ

Как уже было отмечено, в генетическом смысле оба пола как у дрозофилы или нематоды, так и у млекопитающих различаются только числом и составом половых хромосом. При этом у самцов гены, локализованные в *X*-хромосоме, представлены в одной дозе, а у самок — в двух.

Если бы *X*-хромосомные гены функционировали с одинаковой интенсивностью, количество продуктов этих генов у самок было бы вдвое большим, чем у самцов. Однако этого не происходит.

Существуют механизмы компенсации дозы генов. Разумно *a priori* предположить, что для уравновешивания интенсивности функционирования *X*-хромосомных генов можно заставить их работать вдвое интенсивнее у самцов или же инактивировать одну из *X*-хромосом у самок. Природа использовала оба механизма.

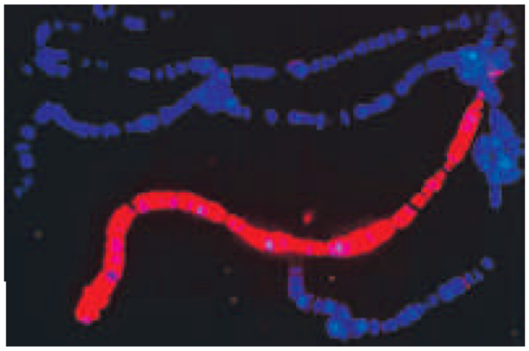
У дрозофилы единственная *X*-хромосома самца дополнительно активируется до уровня двух *X*-хромосом самки, а у млекопитающих инактивируется одна *X*-хромосома, в результате чего экспрессия у самок уменьшается до уровня единственной *X*-хромосомы самца. Промежуточный вариант обнаружен у *C. elegans*.

14.7.1. Компенсация дозы генов у дрозофилы

Основные открытия в области дозовой компенсации у дрозофилы были сделаны в результате анализа политенных хромосом слюнных желез личинок. У самцов (*XY*) единственная политенная *X*-хромосома должна бы быть наполовину тоньше, чем две спаренные аутосомы или две спаренные *X*-хромосомы у самки. Однако на цитологических препаратах она тоньше только на 25 % и выглядит значительно более разрыхленной, чем остальные хромосомы и *X*-хромосомы у самки. Вообще известно, что разрыхленность структуры хромосом связана с более активной транскрипцией в них. Компактный материал транскрипционно неактивен, декомпактизованный разрыхленный материал обнаруживает высокую активность в синтезе РНК.

Уже первые эксперименты показали, что в единственной политенной *X*-хромосоме самца количество негистоновых белков примерно в 1,5 раза больше, чем в одной *X*-хромосоме самки. Разрыхленность и обогащенность негистоновыми белками является структурной основой для дозовой компенсации. Действительно,

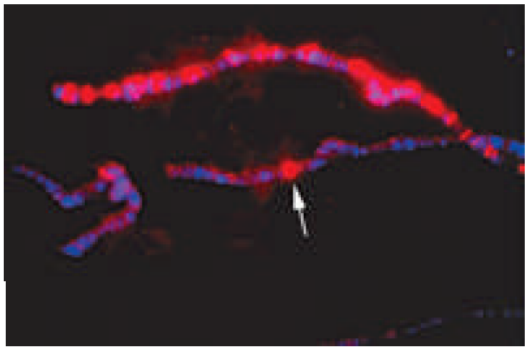
Рисунок 14.9



Локализация белка MLE (красная флуоресценция) в политенной *X*-хромосоме самца. Аутосомы окрашены синей флуоресцирующей краской и не содержат белка MLE.

Рисунок любезно предоставили М. Курода (M. Kuroda) и П. Гордадзе

Рисунок 14.10



Локализация белков дозово-компенсирующего комплекса у мутантов *msl3*, имеющих трансгенный *roX-2* в аутосоме.

В *X*-хромосоме выявляются только 20–40 районов (entry sites), в аутосоме присутствует один участок, соответствующий сайту встраивания гена *roX-2* (указан стрелкой).

Рисунок любезно предоставили М. Курода (M. Kuroda) и П. Гордадзе

интенсивность транскрипции в одной политенной *X*-хромосоме самца в два раза выше, чем в одной *X*-хромосоме самки.

Оказалось, что существует механизм, контролирующий формирование разрыхленной структуры единственной *X*-хромосомы самца. Выделены продукты пяти генов: *msl-1, msl-2, msl-3*, *mle* (MSL-белки) и *mof*, а также по крайней мере два вида РНК, участвующих в этом процессе. Все пять белков образуют комплекс и связываются с сотнями участков *X*-хромосомы самца, обеспечивая диффузность ее структуры. Присутствие каждого из MSL-белков необходимо для нормального функционирования всего комплекса. Комплекс дозовой компенсации локализуется только в *X*-хромосомах самцов (рис. 14.9).

Рассмотрим кратко характеристики белков, входящих в этот комплекс.

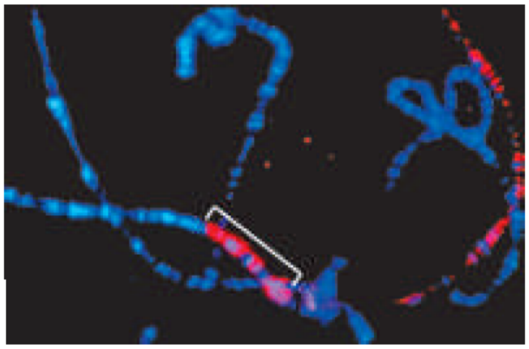
В белке MSL-2 был обнаружен особый участок, имеющий способность интенсивно связываться с ДНК и называемый ринг-фингером, белок MSL-3 имеет другой активный участок — хромодомен — особенность, характерную для белков, связывающихся с хроматином. Кроме MSL-белков в этом процессе участвуют молекулы других белков — гистонов Н4. Гистоны обычно выполняют обратную функцию — в комплексе с молекулой ДНК они образуют нуклеосомы, в составе которых ДНК упаковывается более плотно и становится более компактной. Гистоны Н4, декомпактизующие *X*-хромосому, отличаются от гистонов Н4, компактизующих ДНК, тем, что они модифицированы: аминокислота лизин, находящаяся в 16-м положении в молекуле Н4, у них ацетилирована, т. е. содержит ацетильный остаток. Оказалось, что такие модифицированные гистоны (H4Ac16) в хромосомах локализуются в тех же районах, что и MSL-белки. Модификацию гистонов Н4, по-видимому, производят белки MOF, входящие в комплекс. Как выяснилось, ген *mof* кодирует фермент ацетилтрансферазу.

Предполагают, что белки MSL взаимодействуют с регуляторными элементами хромосом, контролирующими транскрипцию и структуру хроматина. Молекулярный анализ гена *mle* показал, что он имеет гомологию с известными ранее генами, участвующими в расплетании двух цепей ДНК — процессе, необходимом для транскрипции (фермент геликаза). Белок MLE имеет АТР-связывающий домен, и его часто называют РНК-геликазой.

Белки MSL обладают также другой особенностью. Недавно удалось показать, что антитела, выработанные на белки MSL у *Drosophila melanogaster,* связываются также с *X*-хромосомами самцов других видов двукрылых насекомых. Это свидетельствует о том, что все белки, участвующие в дозовой компенсации, высококонсервативны, а сам механизм дозовой компенсации возник в эволюции очень давно.

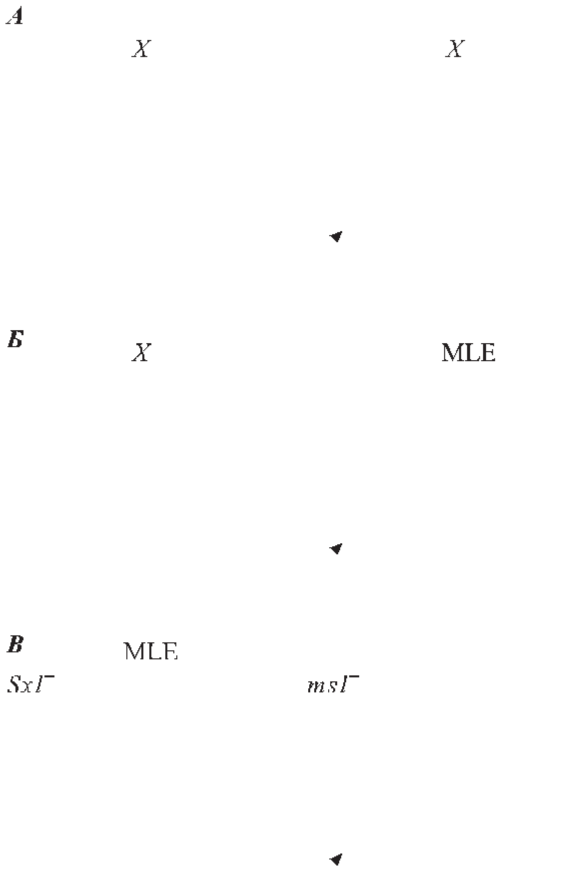
В 1997 г. было установлено существование нового класса РНК, не кодирующих белки и имеющих замечательное свойство связываться с политенными *X*-хромосомами только у самцов. Эти РНК называют *roX* (RNA on *X*-chromosome). К настоящему времени выделе-

Рисунок 14.11



Распространение *roX*-белкового комплекса в участке встраивания *roX*-гена в аутосому (скобка).
Справа расположена *X*-хромосома самца.
Рисунок любезно предоставили М. Курода (M. Kuroda) и П. Гордадзе

Рисунок 14.12



Морфология *X*-хромосом (*А*) и присутствие специфических белков (*Б*) в *X*-хромосомах у самцов и самок дрозофилы, а также изменение этих свойств (*В*) у мутантов по генам, влияющим на развитие пола [Henikoff, Meneely, 1993].

А. У самок все политенные хромосомы кариотипа, включая *X*-хромосому, имеют одинаковую степень разрыхленности. У самцов *X*-хромосома выглядит значительно более диффузной, чем остальные хромосомы у самцов и все хромосомы у самок.

Б. Белок, кодируемый геном *mle*, а также гистоны H4, ацетилированные по лизину в 16-м положении, выявляются только в *X*-хромосоме самца.

В. У мутантов, влияющих на развитие половых признаков, изменяется распределение белков MLE. Так, у мутантов *Sxl* белок MLE появляется в *X*-хромосомах самок, чего никогда не наблюдается в норме. Мутация гена *msl* приводит к отключению дозовой компенсации в *X*-хромосоме самца из-за отсутствия в ней белка MLE

ны 2 гена *roX* — *roX-1* и *roX-2*. С обоих генов считываются транскрипты, специфичные только для самцов.

Существование и распределение РНК в *X*-хромосоме зависит от наличия полного белкового дозово-компенсирующего комплекса. У мутантных личинок, у которых отсутствует один из белков MSL — MSL-1, MSL-3 или MLE, *X*-хромосома самца не покрыта РНК-белковым комплексом полностью, выявляется только от 20 до 40 сайтов (рис. 14.10). Эти сайты были названы входными (entry) участками в хроматин. Два из них соответствуют участкам локализации генов *roX-1* и *roX-2* (в районах 3F и 10C). Полагают, что вокруг синтезирующейся РНК генов *roX* и образуется РНК-белковый дозово-компенсирующий комплекс. Такой комплекс образуется и в участке встраивания гена *roX* в аутосому.

Анализ последовательностей нуклеотидов в генах *roX-1* и *roX-2* показал, что они разные, однако в *X*-хромосомах локализуются в одних и тех же местах. По-видимому, в комплекс входят различные РНК из семейства *roX*.

В участках встраивания гена *roX* в аутосому очень часто происходит экспансия образования *roX*-белковых комплексов на соседние, в том числе и весьма удаленные, районы. Так, если на рис. 14.10 виден небольшой меченый участок в сайте встраивания гена *roX*, то на рис. 14.11 этот участок очень большой, что свидетельствует о распространении комплекса вдоль по хромосоме.

Дозовая компенсация у дрозофилы контролируется тем же геном *Sxl*, который осуществляет и общий контроль за развитием пола. Нормальный белок гена *Sxl* предотвращает дозовую компенсацию у самок, не позволяя белкам MSL расположиться на *X*-хромосомах. В случае мутации гена *Sxl* белки MSL появляются в *X*-хромосомах самок (рис. 14.12, *В*), нарушая тем самым весь процесс дозовой компенсации.

Рисунок 14.13

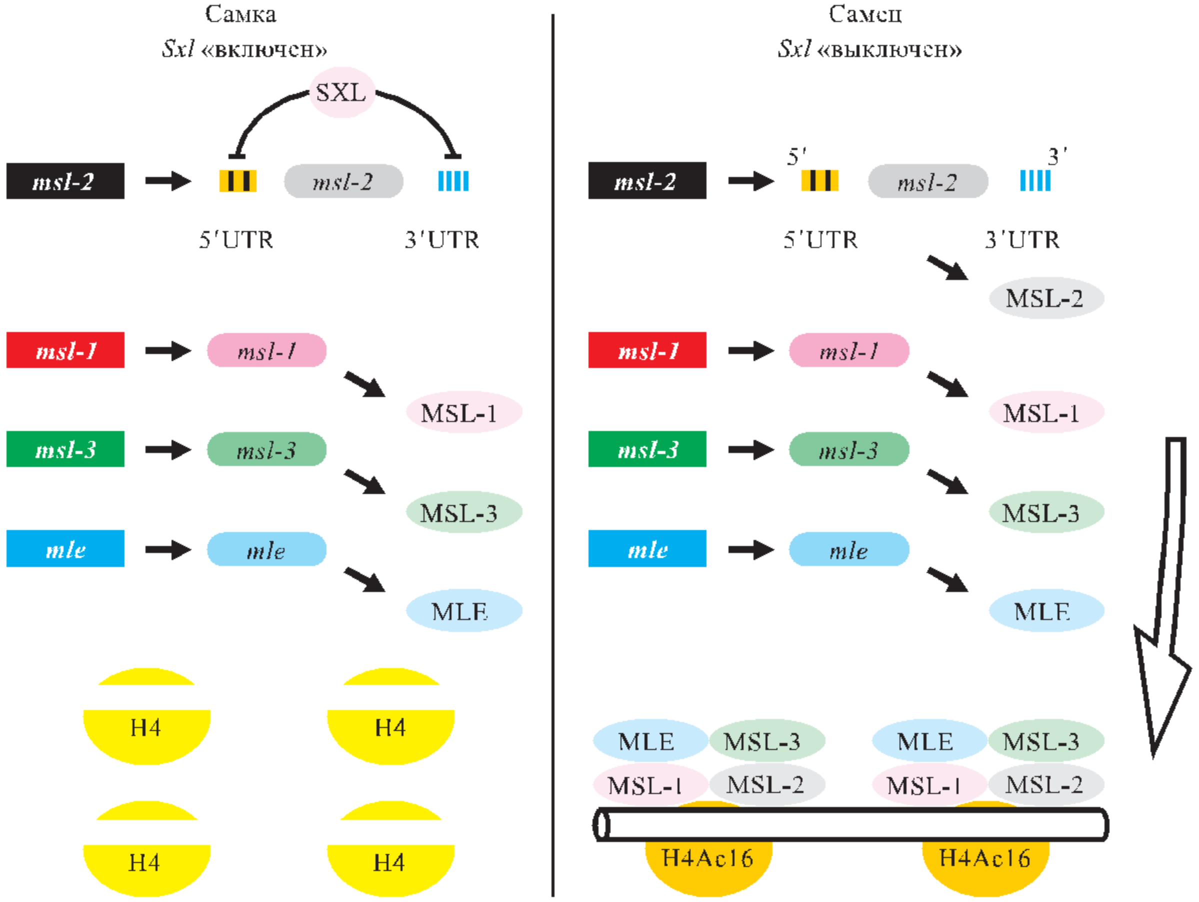


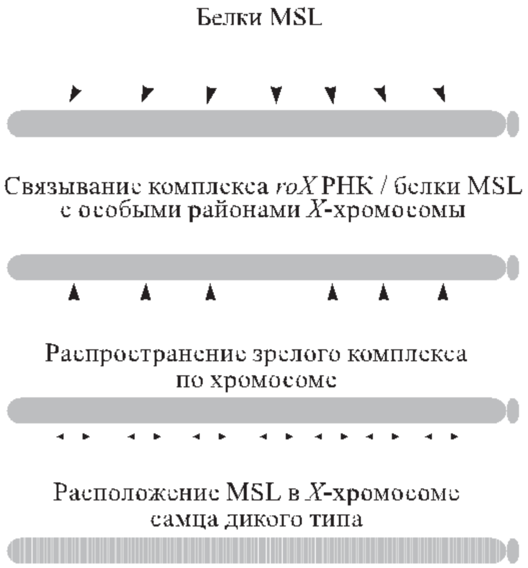
Схема регуляции дозовой компенсации у дрозофилы [Bashaw, Baker, 1996]. Объяснение в тексте

Полагают, что продукт гена *Sxl* взаимодействует в первую очередь с геном *msl-2* (рис. 14.13).

У самок, у которых отношение числа *X*-хромосом к числу наборов аутосом равно единице, ген *Sxl* находится во «включенном» состоянии и он подавляет трансляцию мРНК гена *msl-2*. Небольшой интрон в 5'-нетранслируемом районе (5'UTR) удаляется в транскрипте гена *msl-2* у самца, но сохраняется в транскрипте самки. Таким образом белок гена *Sxl* непосредственно контролирует альтернативный сплайсинг этого интрона. В гене *msl-2* есть еще один сайт связывания с белком SXL — на 3'-конце (3'UTR). Непонятно, каким образом все это влияет на трансляцию гена *msl-2* у самки, тем не менее продукт гена *msl-2* не поступает в ядро. В его отсутствие другие белки MSL не способны ассоциироваться с *X*-хромосомами, ацетилированные формы гистонов H4Ac16 не накапливаются и *X*-хромосома самки не становится сверхактивной в транскрипции (см. рис. 14.13).

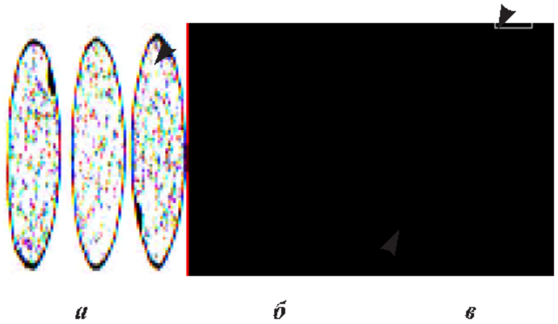
У самцов, где отношение числа *X*-хромосом и наборов аутосом составляет 0,5, ген *Sxl* «выключен». В отсутствие продукта *Sxl* ген *msl-2* экспрессируется полностью и весь набор белков MSL ассоциируется с *X*-хромосомой самца. Субъединицы белков проникают в ядро и организуются в комплексы в 20–40 «входных» сайтах (рис. 14.14) *X*-хромосомы, вокруг синтезирующихся *roX* РНК. По мере созревания комплексы перемещаются между различными «входными» сайтами, в результате чего комплексы, содержащие *roX-1* РНК, могут поступать в участки локализации *roX-2*. Комплексы перемещаются по *X*-хромосоме в *цис*-направлении. В результате *roX*-белковый комплекс связывается с несколькими сотнями генов-мишеней, происходит и ацетилирование гистонов

Рисунок 14.14



Модель связывания белков MSL с хроматином *X*-хромосомы самца дрозофилы [Kelley et al., 1999]

Рисунок 14.15



Тельца Барра, или половой хроматин (указаны стрелками) [МакКьюсик, 1967. С. 28]: *а* — клетки женщины (*XX*) имеют одно тельце Барра; *б* — в клетках мужчины (*XY*) тельце Барра отсутствует; *в* — у индивидуумов с тремя *X*-хромосомами (*XXX* или *XXXY*-синдромы) обнаруживаются два тельца Барра

H4, и, как следствие, изменение структуры хроматина с последующей гиперактивацией транскрипции.

Литература к разделу 14.7.1

Bashaw G. J., Baker B. S. Dosage compensation and chromatin structure in *Drosophila* // Curr. Opin. Genet. Developm. 1996. Vol. 6. P. 496–501.

Gu W., Szauter P., Lucchesi J. C. Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the *X* chromosome of *Drosophila melanogaster* // Devel. Genet. 1998. Vol. 22. P. 56–64.

Henikoff S., Meneely P. M. Unwinding dosage compensation // Cell. 1993. Vol. 72. P. 1–2.

Hilfiker A., Hilfiker-Kleiner D., Pannuti A., Lucchesi J. C. *mof*, a putative acetyl transferase gene related to the *Tip60* and *MOZ* human genes and to the *SAS* genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila* // The EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 2054–2060.

Kelley R. L., Meller V. H., Gordadze P. R. et al. Epigenetic spreading of the *Drosophila* compensation complex from *roX* RNA genes into flanking chromatin // Cell. 1999. Vol. 98. P. 513–522.

Kelley R. L., Kuroda M. I. Noncoding RNA genes in dosage compensation and imprinting // Cell. 2000. Vol. 103. P. 9–12.

Kuroda M. I., Meller V. H. Transient Xist-ence // Cell. 1997. Vol. 91. P. 9–11.

Lucchesi J. C. Dosage compensation in flies and worms: the ups and downs of *X* chromosome regulation // Curr. Opin. in Gen. and Devel. 1998. Vol. 8. P. 179–184.

14.7.2. Компенсация дозы генов у млекопитающих

Как уже было сказано, дозовая компенсация у млекопитающих происходит в результате инактивации одной из *X*-хромосом у самок.

В 1949 г. М. Барр обнаружил компактные глыбки хромосомного материала в ядрах нервных клеток у кошек, у котов таких глыбок не было. По имени исследователя эти структуры были названы тельцами Барра. Через 10 лет С. Оно пришел к выводу, что тельце Барра формируется из одной *X*-хромосомы в каждой соматической клетке у самок млекопитающих (рис. 14.15).

В 1961 г. М. Лайон (M. Lyon) (рис. 14.16) сделала вывод о том, что дозовая компенсация генов, локализованных в *X*-хромосомах млекопитающих, осуществляется за счет инактивации одной из двух родительских хромосом в каждой соматической клетке самки.

Процесс инактивации *X*-хромосом у самок млекопитающих был назван лайонизацией. Лайонизация *X*-хромосомы происходит в раннем эмбриональном развитии. Инактивированная *X*-хромосома гетерохроматинизирована и транскрипционно неактивна на протяжении всего клеточного цикла; она реплицируется в поздней S-фазе, позже аутосом и активной *X*-хромосомы. Таким образом, одна из *X*-хромосом самок млекопитающих приобретает компактное состояние и инактивируется, в результате чего число доз *X*-хромосомных генов у самцов и самок уравнивается и составляет одну дозу.

Рисунок 14.16

Мэри Ф. Лайон
(р. 1925)

Оказалось, что в *X*-хромосомах млекопитающих существует особый центр инактивации (*Xic* — *X* chromosome inactivation center). Инактивация инициируется в единственном центре инактивации и затем прогрессивно распространяется вдоль всей *X*-хромосомы. Она происходит по закону «все или ничего». Установившись однажды в эмбриогенезе, неактивное состояние *X*-хромосомы передается дочерним клеткам во всех последующих клеточных генерациях. В пользу существования особого и единого центра инактивации *X*-хромосомы свидетельствуют два факта:

1) хромосома инактивируется целиком, и только одна из двух;

2) в *X*-хромосоме, разделенной реципрокной транслокацией, инактивируется только одна часть, вторая часть не компактизуется.

Более того, в результате изучения различных *X*-аутосомных транслокаций было найдено, что только одна часть *X*-хромосомы способна инактивировать примыкающие аутосомные локусы.

Картируя таким образом многие транслокации, удалось локализовать центр инактивации на карте митотических хромосом человека и мыши.

Длина ДНК, занимаемой центром *Xic*, составляет примерно 1 млн пн. Этот район содержит несколько элементов, которые, как полагают, играют роль в инактивации *X*-хромосомы, а также четыре гена. Из них важнейшие:

— *Xist* (*X*-inactive-specific transcript) — ген, кодирующий длинную некодирующую РНК, которая необходима для инактивации *X*-хромосомы;

— *Tsix* — элемент, транскрибируемый с параллельной (антисмысловой) цепи ДНК гена *Xist*, эта РНК контролирует экспрессию гена *Xist*;

— *Xce* (*X* chromosome-controlling element) — контролирует выбор одной из родительских *X*-хромосом, которую следует инактивировать;

— *DXPas34* — район, обогащенный CpG-основаниями, имеющий длину 3 тпн и содержащий 34-членный повтор сателлитной ДНК, необходим для активирования *Tsix*.

Ген *Xist* обладает рядом необычных особенностей: транскрипция его связана только с неактивной *X*-хромосомой самки, РНК гена *Xist* не находят у самцов и особей *X0*, имеющих только одну (активную) *X*-хромосому. Внутри клетки РНК *Xist* не обнаруживается ни в цитоплазме в целом, ни в рибосомах. Это свидетельствует о том, что данный ген не кодирует белок и его РНК не транслируется. Вместе с тем РНК гена *Xist* легко выявляется в клеточном ядре, а именно в тельце Барра. Большинство исследователей предполагает, что эта РНК участвует непосредственно в процессах инактивации *X*-хромосомы.

Ген *Xist* у человека занимает около 45 тпн геномной ДНК, однако суммарная длина его восьми экзонов составляет только 16,5 тпн (рис. 14.17).

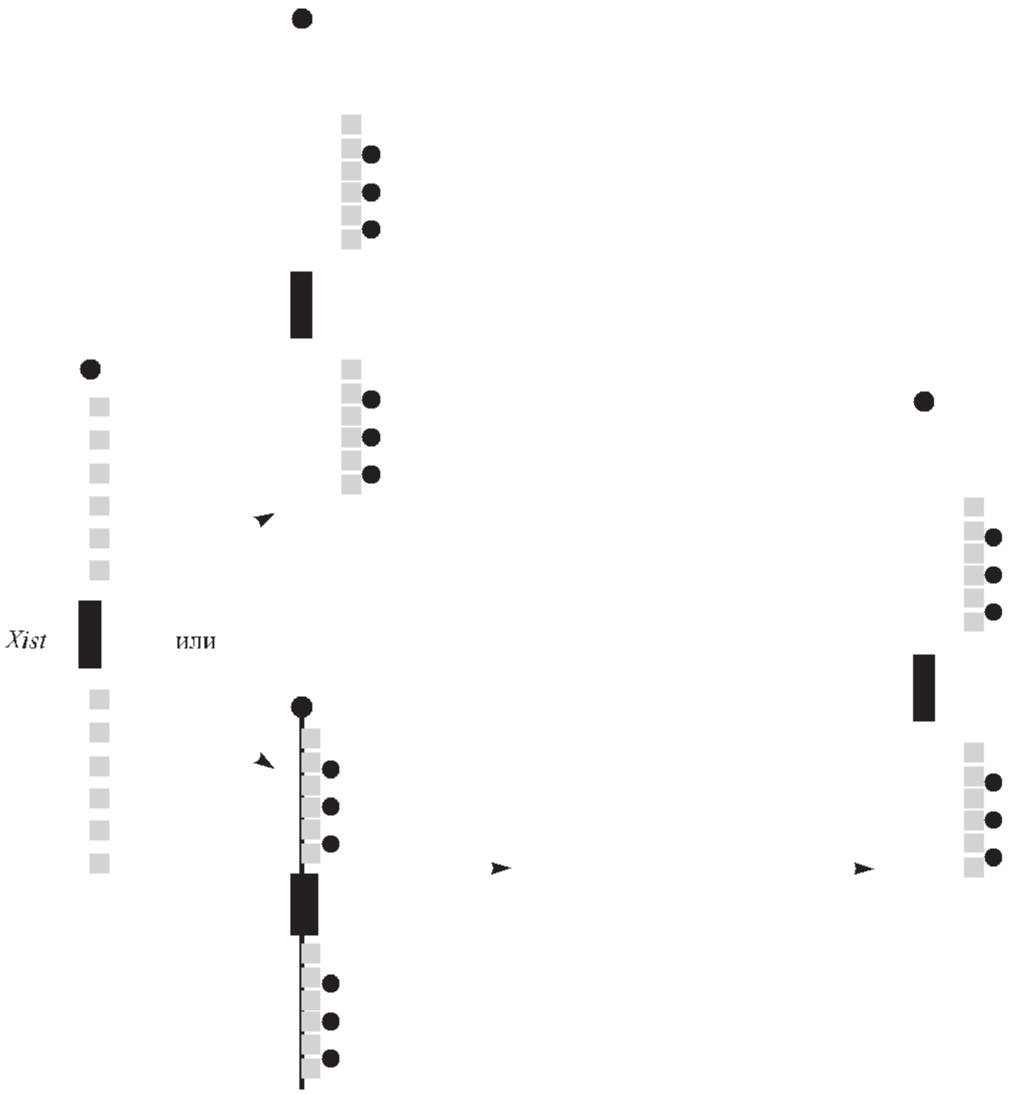
Показано наличие альтернативного сплайсинга при экспрессии гена *Xist*. Множество выделенных клонов кДНК не содержали экзонов 4 или 6i, реже встречались клоны с отсутствием других экзонов. Данные Нозерн-блот анализа позволили обнаружить еще один любопытный факт: сигнал гибридизации выявлялся не в виде дискретных полос, а был представлен непрерывным мазком, указывающим на наличие многочисленных транскриптов гена *Xist*, которые значительно варьируют по размерам, достигая 10 тпн и выше. ПЦР-анализ, предпринятый с целью нахождения стартовой точки транскрипции, выявил несколько транскриптов различной длины, что свидетельствует о гетерогенности в инициации транскрипции гена *Xist* и, следовательно, о наличии нескольких сайтов инициации. Кроме того, отсутствовал ТАТА-домен поблизости от этого стартового сайта, хотя блок СААТ был расположен в положении –99. ТАТА-домен был обнаружен в позиции –39 относительно минорного стартового сайта.

Рисунок 14.17

Экзон-интронная организация гена *Xist* у человека
[Brown et al., 1992. — Из: Нестерова, Закиян, 1994. С. 302].

Экзоны пронумерованы с 5'-конца. Толстыми линиями соединены экзоны, наблюдаемые в клонах кДНК, тонкими — только в RT-ПЦР-анализе. A(n) — поли(A)$^{+}$-последовательность

Рисунок 14.18



Модель участия гена *Xist* в инактивации *X*-хромосомы у самок млекопитающих
[Нестерова, Закиян, 1994. С. 310].

В результате транскрипции гена *Xist*, находящегося в той хромосоме, которая будет впоследствии инактивирована, синтезируется РНК (черные и белые кружки). Взаимодействие этой РНК с материалом хромосомы (серые квадраты) приводит к укорочению и компактизации хромосомы (гетерохроматинизации, показано зигзагом) или, по другой версии, материал хромосомы, связанной с РНК *Xist*, объединяется с каким-то веществом, которое затем связывает инактивированную *X*-хромосому с ядерной мембраной

Ген *Xist* был найден у многих млекопитающих. У всех видов в экзонах нет длинных рамок считывания, самая длинная — 483 пн, т. е. примерно 3 % от общей длины экзонов.

Распространение сигнала от гена *Xist* на другие участки *X*-хромосомы не требует наличия последовательностей, специфичных для этой хромосомы. Но инактивирующий сигнал распространяется более эффективно именно в *X*-хромосоме.

Для объяснения этого факта была предложена гипотеза о наличии в *X*-хромосоме участков усиления и передачи сигналов («way stations» или «boosters»). Природа этих участков усиления неизвестна, хотя накапливаются сведения о том, что это могут быть умеренные повторы. Распределение элементов LINE (см. разд. 6.7.4) не соответствует G-окраске; они «окрашивают» *X*-хромосому у мыши и человека равномерно и очень ярко. Поэтому полагают, что LINE-элементы могут рассматриваться в качестве кандидатов на роль усилителей сигнала от гена *Xist*.

Согласно современным представлениям (рис. 14.18), РНК *Xist* взаимодействуют локально с хроматином той *X*-хромосомы, с которой инициируется транскрипция *Xist*. Это приводит к компактизации хромосомы и связыванию ее с ядерной оболочкой, в результате чего из одной *X*-хромосомы у самки млекопитающих формируется плотное образование, называемое половым хроматином или тельцем Барра. Происходит инактивация всех генов в этой *X*-хромосоме, и уравнивается число доз *X*-хромосом у обоих полов.

Не все гены *X*-хромосомы подвергаются инактивации в результате действия гена *Xist*. На концах как *X*-, так и *Y*-хромосом человека имеются небольшие группы генов (псевдоаутосомные районы — PAR), остающиеся активными. Они гомологичны в *X*- и *Y*-хромосомах. PAR1-район, располагающийся на конце короткого плеча, имеет длину 2600 тпн и содержит 8 генов. Только два гена (320 тпн) обнаружены на конце длинного плеча. Эти псевдоаутосомные районы конъюгируют в ходе мейоза и рекомбинируют [Graves et al., 1998].

Результаты, рассмотренные в данном разделе, свидетельствуют об огромных успехах, достигнутых современной генетикой в изучении процессов, определяющих признаки пола. Хотя перевернуты лишь первые страницы в этой увлекательной истории, тем не менее совершенно очевидно, что такие сложные процессы, как формирование половых признаков, управляются простыми взаимодействиями генов.

Литература к разделу 14.7.2

МакКьюсик В. Генетика человека. М.: Мир, 1967. С. 27–36.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 202–225.

Нестерова Т. Б., Закиян С. М. Инактивация *X*-хромосомы у млекопитающих // Генетика. 1994. Т. 30. С. 293–317.

Основы цитогенетики человека / Под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской. М.: Медицина, 1969. С. 247–309.

Смирнов А. Ф. Молекулярно-генетические механизмы первичной детерминации пола у млекопитающих // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 26–34.

Avner P., Heard E. *X*-chromosome inactivation: counting, choice and initiation // Nature Review Genetics. 2001. Vol. 2. P. 59–67.

Graves J. A. M., Wakefield M. J., Toder R. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes // Human Molecular Genetics. 1998. Vol. 7. P. 1991–1996.

Kuroda M. I., Meller V. H. Transient Xist-ence // Cell. 1997. Vol. 91. P. 9–11.

Lyon M. F. Possible mechanisms of *X* chromosome inactivation // Nature New Biol. 1971. Vol. 232. P. 229–232.

Lyon M. F. Some milestones in the history of *X*-chromosome inactivation // Ann. Rev. Genet. 1992. Vol. 26. P. 17–28.

Lyon M. F. *X* chromosome inactivation: a repeat hypothesis // Cytogenet. Cell Genet. 1998. Vol. 80. P. 133–137.

Panning B., Jaenisch R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation // Cell. 1998. Vol. 93. P. 305–308.

Sheardown S. et al. Stabilization of *Xist* RNA mediates initiation of *X* chromosome inactivation // Cell. 1997. Vol. 91. P. 99–107.

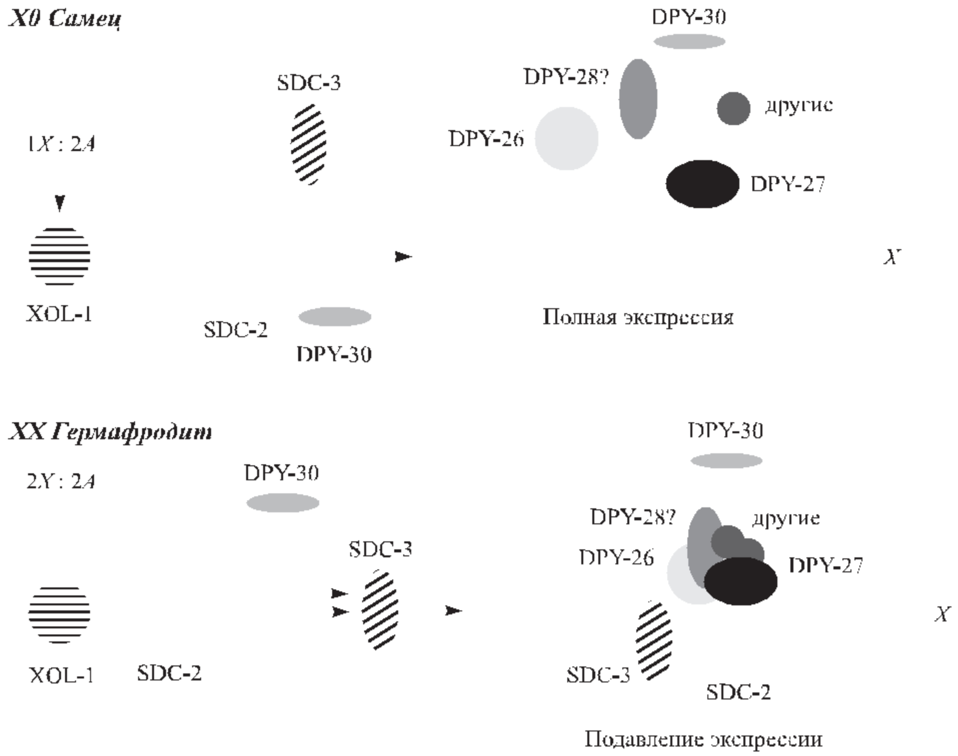
Willard H. F. *X*-chromosome inactivation, *Xist* and pursuit of the *X*-inactivation center // Cell. 1996. Vol. 86. P. 5–7.

14.7.3. Дозовая компенсация у Caenorhabditis elegans

У *C. elegans* дозовая компенсация достигается за счет снижения уровня транскрипции *X*-связанных генов у *XX*-гермафродитов, в результате уровень продукта этих генов такой же, как у *X0*-самцов. Рассмотрим этот механизм.

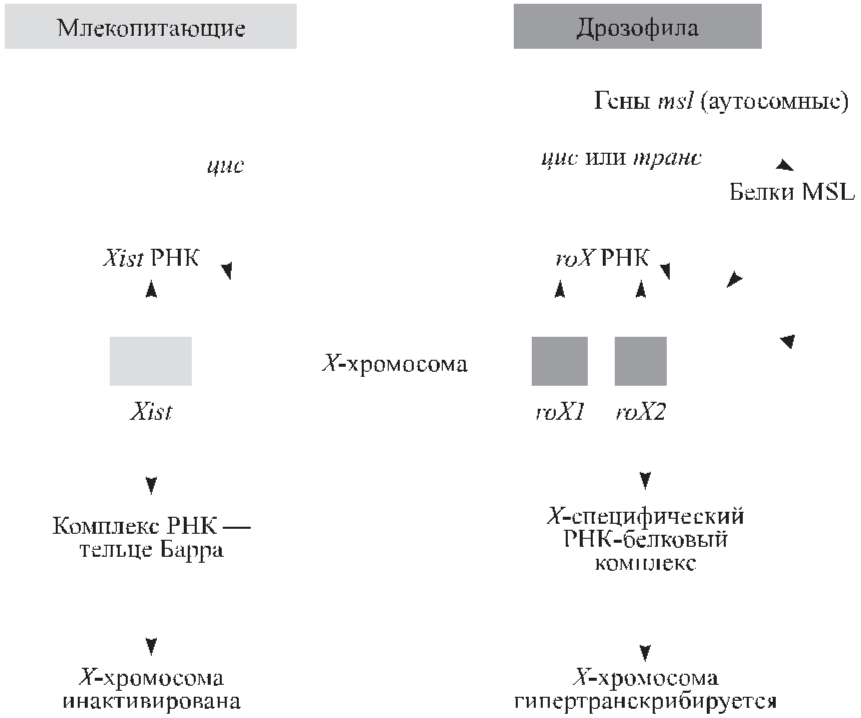
У самцов XOL-1 инактивирует ген *sdc-2*, предотвращая таким образом формирование дозово-компенсирующего комплекса на *X*-хромосоме. В результате достигается полный уровень экспрессии генов в *X*-хромосоме (рис. 14.19). У гермафродитов ген *sdc-2* активен и вместе с геном *dpy-30* активирует *sdc-3*. Белки SDC-2 и SDC-3 локализуются на *X*-хромосоме и участвуют в формировании белкового комплекса DPY, который редуцирует уровень экспрессии обеих гермафродитных *X*-хромосом.

Рисунок 14.19



Формирование дозово-компенсирующего белкового комплекса на *X*-хромосомах у самцов и гермафродитов *C. elegans* [Meyer, 1997. P. 229]

Рисунок 14.20



Участие некодирующей РНК в ремоделировании хроматина *X*-хромосомы млекопитающих и дрозофилы [Willard, Salz, 1997. P. 229]

Таблица 14.2. Сопоставление механизмов дозовой компенсации у млекопитающих и дрозофилы [Willard, Salz, 1997. P. 228, с дополнениями]

Млекопитающие	Дрозофила
Результат компенсации	
Инактивация транскрипции	Гипертранскрипция
События в ходе компенсации	
Участие некодирующей РНК *Xist* Локализуется в *X*-хромосоме Действует в *цис*-положении	Участие некодирующей РНК *roX* Локализуется в *X*-хромосоме Действует в *цис*- или *транс*-положении
Образование комплекса тельце Барра – *Xist* РНК	Образование РНК-белкового комплекса на *X*-хромосоме
Гипоацетилирование гистона Н4	Гиперацетилирование гистона Н4
Позднее завершение репликации ДНК	Формирование диффузной разрыхленной структуры, раннее завершение репликации

14.7.4. Заключение

Как следует из рассмотренных в этом разделе данных, в ходе эволюции сформировалось по крайней мере три механизма дозовой компенсации: гипертранскрипция, гипотранскрипция и репрессия транскрипции. В двух из них обнаружены неожиданные параллели, связанные с участием некодирующих молекул РНК, однако результаты действия этих РНК оказываются различными (табл. 14.2, рис. 14.20).

Литература к разделу 14.7.4

Willard H. F., Salz H. K. Remodelling chromatin with RNA // Nature. 1997. Vol. 386. P. 228–229.

Глава 15
ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ

15.1. ПРЕФОРМИЗМ И ЭПИГЕНЕТИКА

Вопрос о том, как из оплодотворенного яйца вырастает целый организм и как возникают различия между составляющими его клетками, интересует людей почти 2000 лет, но тем не менее до сих пор остается одной из основных проблем биологии, и генетики развития в частности.

В ходе развития формируются многочисленные органы и ткани, совершенно не похожие друг на друга. Они организованы для выполнения определенных функций, и каждая ткань поразительно отличается от остальных. Необходимо решить две проблемы: каким образом ткани дифференцируются и каким образом дифференцированное состояние, характерное для каждой клетки, наследуется в ряду клеточных поколений.

Долгое время в биологической науке существовало мнение, что процесс развития — это простой рост органов организма, уже сформированного (преформированного) в клетках зародышевого пути (рис. 15.1).

Рисунок 15.1

Миниатюрный человечек, формирующийся, по мнению ранних биологов, в сперматозоиде человека [Hartsoeker, 1694. — Из: Srb et al., 1965. P. 353]

В 1759 г. Вольф (Wolf) предложил теорию эпигенеза, согласно которой каждый организм развивается в ходе онтогенеза не из преформированных органов, а из простого неорганизованного зародыша путем последовательного ряда новообразований.

По современным представлениям, жизненный путь любого организма — это постоянное обновление всех клеток, тканей и органов. Детали этого процесса обновления определяются структурами, сформировавшимися на предыдущих стадиях. Согласно этой точке зрения, развитие не останавливается на какой-то определенной точке, а продолжается всю жизнь.

Зависимость развития от активности генов, заключенных в клеточном ядре, установлена в многочисленных опытах. Показана также роль цитоплазмы в поддержании определенного дифференцированного состояния клетки в целом.

По мнению Т. Моргана, высказанному еще в 1930-х гг., «ранние стадии развития определяются протоплазмой яйца, влияние же хромосом сперматозоида сказывается позже. Это означает, что протоплазма яйца уже подверглась влиянию генов, содержащихся в самом яйце...» [Морган, 1937. С. 129]. «По мере протекания развития приходят в действие различные группы генов» [Там же. С. 13].

Литература к разделу 15.1

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 344–358.

Астауров Б. Л. Проблемы индивидуального развития. (Итоги и задачи) // Журн. общ. биол. 1968. Т. 29, № 2. С. 139–152.

Корочкин Л. И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. 200 с.

Корочкин Л. И. Развитие исследований по феногенетике животных в СССР // Онтогенез. 1977. Т. 8, № 6. С. 547–562.

Корочкин Л. И. Как гены контролируют развитие клеток // Соросовский образовательный журн. 1996. № 1. С. 17–22.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. 252 с.

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. 751 с.

Маркерт К., Уршпрунг Г. Генетика развития. М.: Мир, 1973. 270 с.

Морган Т. Г. Развитие и наследственность. Л.: Биомедгиз, 1937. 241 с.

Соколова К. Б. Развитие феногенетики в первой половине XX века. М.: Наука, 1998. 160 с.

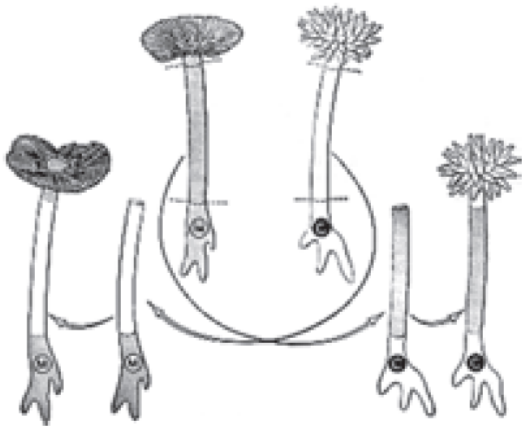
Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S. General genetics. 2nd ed. San Francisco; London: W. H. Freeman and company, 1965. 577 p.

15.2. РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА В РАЗВИТИИ

Для выяснения роли ядра в развитии проводили различные эксперименты. Г. Геммерлинг (H. Hämmerling) провел опыты с замещением ядра у водоросли *Acetabularia*. Он использовал два вида этого рода — *A. mediterranea* и *A. crenulata,* различающиеся формой шляпки (рис. 15.2). В период вегетативного цикла эта водоросль представляет собой крупную одноядерную клетку с длиной стебелька до 6 см. Различные виды ацетабулярии имеют специфическую форму шапочки.

Ядро находится в одном из ризоидов. Если шапочку или стебелек с шапочкой отрезать, они вновь регенерируют из ризоида, содержащего ядро. При этом сохраняется форма шапочки, характерная для данного вида. Когда сращивали отрезанный стебелек одного вида с ризоидом другого, регенерирующая на стебельке шапочка имела форму, свойственную виду, которому принадлежало ядро (см. рис. 15.2). Такой же результат был получен в том случае, когда извлеченное из ризоида ядро одного вида пересаживали в изолированный стебелек другого вида.

Рисунок 15.2

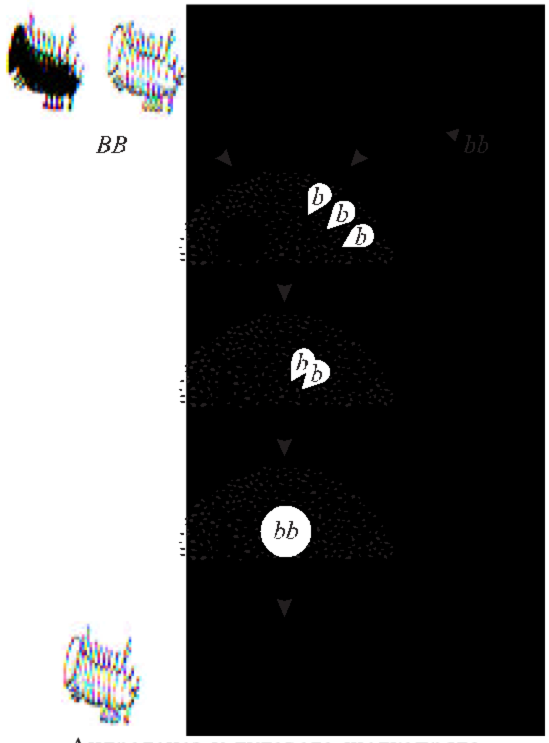


Регенерация шляпки при перекрестном сращивании у ацетабулярии [Hämmerling, 1943. — Из: Srb et al., 1965. P. 353].

A. mediterranea и *A. crenulata* изображены соответственно серым и белым цветом

Б. Л. Астауров, основываясь на резко различающейся чувствительности ядра и цитоплазмы к ионизирующим излучениям, показал решающую роль ядра в определении признаков многоклеточных организмов. В норме у бабочки шелкопряда в яйцо при оплодотворении проникает несколько спермиев, но с ядром яйца сливается ядро только одного из них, остальные спермии остаются на его периферии и затем распадаются, не участвуя в образовании и развитии зародыша. Подвергая неоплодотворенные яйца шелкопряда тепловому шоку и рентгеновскому облучению, можно полностью разрушить их ядра, не повредив цитоплазму, которая гораздо менее чувствительна к этим воздействиям. Если затем такие яйца осеменить, то ядра двух спермиев сливаются друг

Рисунок 15.3



Андрогенез у тутового шелкопряда [По Б. Л. Астаурову. — Из: Гершензон, 1983. С. 83]

с другом и образуют зиготу. Следовательно, здесь зигота имеет ядро, происходящее исключительно от отца, цитоплазма же целиком материнская. Развивающиеся из таких андрогенетических зигот особи шелкопряда всегда были самцами и довольно точно повторяли фенотип своих отцов, что особенно заметно, когда яйца принадлежали бабочкам одной породы, а спермии — другой (рис. 15.3).

Литература к разделу 15.2

Астауров Б. Л. Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. М.: Наука, 1977. 344 с.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 390–418.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 24–40.

Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S. General genetics. 2nd ed. San Francisco; London: W. H. Freeman and company, 1965. P. 353.

15.3. ТОТИПОТЕНТНОСТЬ ГЕНОМА

До сих пор обсуждается вопрос о том, сопровождается ли специализация клеток животных утратой генов, которые далее не понадобятся для каждого данного типа клеток. Например, сохраняются ли в ядре клеток кишечника гены, необходимые для синтеза гемоглобина — белка, характерного для эритроцитов, а в ядре нервной клетки — гены, необходимые для образования миозина — особого белка мышечных клеток? Если «ненужные» гены утрачиваются, то именно эта постоянная утрата различных генов и определяет специализацию клеток, как предположил А. Вейсман еще в 1892 г. Противоположная точка зрения сводится к тому, что во всех клетках сохраняются все гены, однако в тех клетках, где их деятельность не нужна, они находятся в неактивном состоянии.

Для того чтобы решить, какая из этих гипотез верна, часто используют метод трансплантаций ядер (дополнение 15.1). Дж. Гёрдон (рис. 15.5) трансплантировал ядра из специализированных клеток эпителия кишечника головастиков шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (рис. 15.6) в неоплодотворенное яйцо этого же вида, из которого предварительно было удалено свое ядро. При этом необходимо использование какого-либо ядерного маркера, который позволяет отличить потомков пересаженного ядра от потомков ядра-хозяина, поскольку нельзя быть уверенным, что не произошло слу-

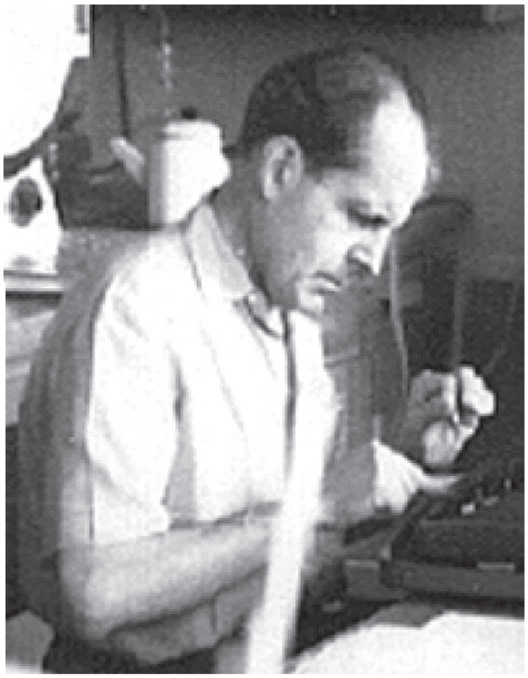
Дополнение 15.1

История трансплантации ядер уходит в далекие 1940-е гг., когда российский эмбриолог Г. В. Лопашов (рис. 15.4) разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку тритона. Ниже приведен полный текст реферата, опубликованного в 1945 г. [Рефераты работ биологического отделения АН СССР. 1945. С. 88–89].

Лопашов Г. В. Опыты исследования потенций ядер бластулы тритонов методом пересадки. Проблема значения функции ядер в определении дифференцировки клеток является одной из существеннейших проблем биологии. Одинакова ли функция ядер в разнородных клетках или отличия клеток возникают без связи с различными функциями их ядер? После множества предварительных опытов, весной 1941 г., автором была выработана методика пересадок ядер стадий дробления в безъядерные фрагменты цитоплазмы яиц стадий 1–2 бластомер; судьба этих фрагментов в нормальном развитии и их потенции также были определены. Ядра из области будущей мезодермы и энтодермы пересаживались в цитоплазму будущей эктодермы. При приживлении ядер дробление шло значительно медленнее, чем в контроле; вероятно, это можно связать с тем, что размер ядер был непропорционально мал относительно массы цитоплазмы. Ввиду крайней трудности техники и необходимости длительного культивирования получающихся фрагментов определенные результаты были получены только в 9 случаях. В них, насколько можно судить, развитие шло целиком соответственно цитоплазме. Однако лишь более многочисленные опыты и при условии взятия ядер с более поздних стадий могут дать точный ответ на вопрос: приобретают ядра разные функции или нет. В 1944 г. была продолжена разработка методики пересадок ядер, но, ввиду невозможности создать необходимые условия высокой стерильности, опыты ограничились только усовершенствованием техники пересадок.

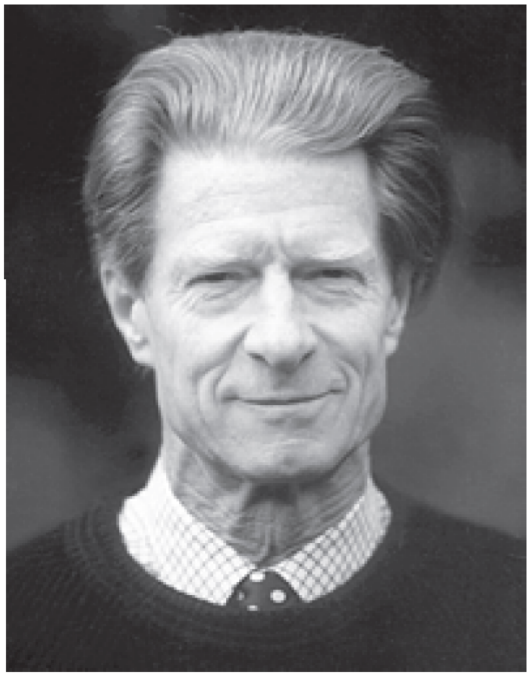
В 1946 г. Г. В. Лопашовым была опубликована первая работа, а в июне 1948 г. он направил объемную статью в «Журнал общей биологии». Однако в августе 1948 г. состоялась печально известная сессия ВАСХНИЛ, и набор этой статьи был рассыпан. Работу Г. В. Лопашова забыли, а в 1952 г. американские эмбриологи Р. Бриггс и Т. Дж. Кинг выполнили сходные опыты. Наиболее успешные эксперименты были проведены английским генетиком Дж. Гёрдоном в 1962 г.

Рисунок 15.4



Георгий Викторович Лопашов
(р. 1912)

Рисунок 15.5



Джон Гёрдон
(р. 1933)

чайной ошибки при удалении ядра-хозяина. Маркером в данном случае служило наличие двух ядрышек в ядрах клетки-хозяина и одного — в пересаживаемых ядрах.

В этих экспериментах около 1 % яиц, в которые были пересажены ядра эпителия, дали взрослых лягушек. Таким образом, нормальная дифференцировка клеток у животных не сопровождается утратой или необратимой инактивацией генов.

В феврале 1997 г. в журнале «Nature» появилась публикация, заставившая обсуждать проблемы генетики развития журналистов, политиков, юристов и государственных деятелей: группа ученых из Шотландии сообщила об успешной трансплантации ядер из дифференцированных клеток в яйцеклетки овец и получении нормально сформированного животного. Эти результаты открывают путь для фактически неограниченного вегетативного размножения любого индивидуума: каждая особь в результате трансплантации ядер из его клеток в реципиентов может дать начало миллиардам совершенно идентичных потомков. Этот процесс называют клонированием.

Схема опыта была аналогичной той, которую использовали Дж. Гёрдон и его сотрудники. Маркерами в данном случае служили масть овец и различные микросателлиты в составе ДНК. Ооциты выделяли из овец шотландской черномордой породы, а донорные клетки были выделены из вымени овец беломордой породы Финн Дорсетт. После этого с помощью электрического импульса сливали энуклеированный ооцит с целой клеткой-донором. Экспериментально полученные зиготы помещали в яйцеводы самок, где они начинали дробиться и развивались в морулы, которые и были пересажены в матки черномордых овец. Из 277 экспериментально полученных зигот только одна прошла все стадии развития вплоть до рождения ягненка, который был беломордым (рис. 15.7) [см. подробнее: Wilmut et al., 1997].

Тот факт, что овечка выросла из яйцеклетки с ядром из клетки взрослого животного, доказывает отсутствие необратимых модификаций генетического материала в ходе нормального развития.

К 2000 г. клонированные мыши и овцы получены после пересадки ядер из культуры клеток в энуклеированные яйцеклетки этих животных.

Создан проект выращивания клонированных животных, которые могли бы быть источником органов для пересадки больным людям. Здесь наиболее привлекательным объектом являются свиньи. Планируется в ядре культивируемой клетки свиньи вначале инактивировать гены, ответственные за синтез в клетках полисахаридов, которые организмом человека опо-

Рисунок 15.6

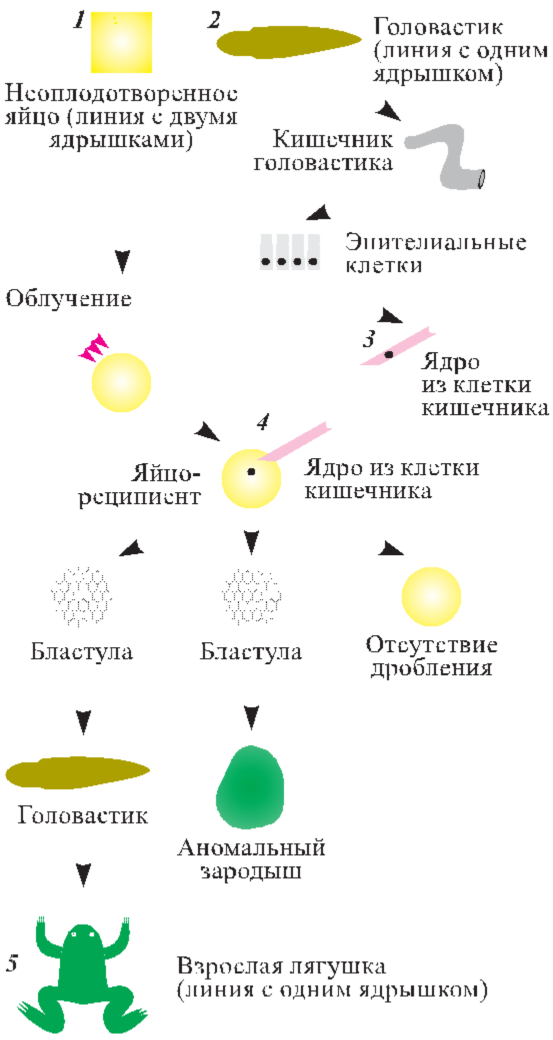


Схема пересадки ядер из кишечника головастика в неоплодотворенное яйцо лягушки *Xenopus laevis* [Гёрдон, 1970. С. 20].

Ядро-реципиент, помеченное наличием двух ядрышек, разрушается в результате облучения ультрафиолетовыми лучами (*1*), затем у головастика выделяют кишечник (*2*) и берут клетки эпителиального слоя. Одиночную эпителиальную клетку засасывают в микропипетку, при этом клеточная оболочка разрушается (*3*), высвобождая ядро. Ядро клетки кишечника пересаживают в подготовленное яйцо (*4*), которое затем развивается. Около 1 % яиц с пересаженными ядрами развиваются в лягушек, имеющих в ядре лишь одно ядрышко вместо обычных двух (*5*)

знаются в качестве чужих и вызывают иммунный ответ. Уже есть первые результаты по получению овцы вследствие трансплантации ядра с искусственно внесенным в него геном $\alpha 1(I)$ проколлагена [McCreath et al., 2000]. Следует оговориться — известны возражения против таких пересадок — вирусы свиньи могут заразить человека.

Рисунок 15.7

Овечка (слева), развившаяся из клетки молочной железы, взятой от овцы беломордой породы и трансплантированной в овцу черномордой породы (справа) [Wilmut et al., 1997]

В исследованиях растений проблема тотипотентности не возникала, так как всем известно, что кусочки листа (т. е. соматические клетки) бегонии дают новые растения с цветами и семенами, точно так же корневые побеги малины ежегодно дают начало новым растениям, а картофель размножается клубнями.

Целые растения вырастают и из отдельных клеток, входящих в состав каллуса [Першина, 2000].

Литература к разделу 15.3

Гёрдон Дж. Пересадка ядер и клеточная дифференцировка // Молекулы и клетки. Вып. 5. М.: Мир, 1970. С. 19–37.

Корочкин Л. И. Клонирование животных // Соросовский образовательный журн. 1999. № 4. С. 10–16.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 24–40.

Лопашев Г. В. Пересадки компонентов ядер овоцитов в оплодотворенные яйца тритонов // Докл. АН СССР. 1946. Т. 52, № 4. С. 365–368.

Першина Л. А. Культивирование изолированных клеток и тканей растений. Ч. 1. Новосибирск: Изд. НГУ, 2000. 44 с.

McCreath K. J. et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells // Nature. 2000. Vol. 405. P. 1066–1067.

Wakayama T., Rodrigues I., Perry A. C. F., Yanagimachi R., Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1999. Vol. 96. P. 14984–14989.

Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell // Nature. 1997. Vol. 385. P. 810–813.

15.4. ДЕТЕРМИНАЦИЯ

Детерминация представляет собой важное событие, в результате которого клетки с одинаковым набором генов начинают различаться по своим внешним признакам, или фенотипу. Другими словами, детерминация — это установление определенного пути развития для части эмбриона, который будет поддерживаться независимо от всех последующих ситуаций. Очевидно, что у детерминированных клеток происходит сужение потенций. Много серьезных вопросов стоит перед исследователями: на какой стадии развития зародыша происходит эта детерминация? Насколько устойчиво такое состояние клетки? Наследуется ли это состояние всеми клетками, происходящими от детерминированной клетки-предшественника? Можно ли изменить детерминированность и переключить эти клетки на развитие в новых направлениях?

Для ответов на эти вопросы швейцарский генетик Э. Хадорн (рис. 15.8) использовал плодовую мушку дрозофилу. Известно, что в развитии высших насекомых, в том числе мух, происходит интересное разделение клеток по их функциям. Клетки одного типа начинают дифференцироваться с первых этапов эмбрионального развития, из них образуется тело личинки насекомого со всеми его органами. Клетки другого типа обособлены, они составляют так называемые имагинальные диски, или зачатки взрослых органов. Хотя клетки имагинальных дисков находятся в контакте с соседними дифференцирующимися клетками, они пребывают в эмбриональном состоянии в течение всего личиночного периода. В это время они делятся. В процессе метаморфоза значительная часть личиночных органов рассасывается (лизируется). Одновременно с этим клетки имагинальных дисков утрачивают свое эмбриональное состояние, они дифференцируются, превращаясь в специализированные ткани имаго (взрослой мухи). Из каждого диска образуется отдельная часть тела насекомого. Например, для каждой из шести будущих ног существует отдельный диск, голова образуется из трех пар дисков.

Рисунок 15.8

Эрнст Хадорн
(1902–1976)

Имагинальные диски можно извлечь из тела личинки и пересадить в полость тела другой личинки. Когда личинка-хозяин превращается в куколку, трансплантант дифференцируется в соответствующий орган. Например, если трансплантирован глазной имагинальный диск, в брюшке личинки-хозяина развивается полностью сформировавшийся глаз.

В результате многих опытов Э. Хадорн обнаружил, что каждый имагинальный диск представляет собой своего рода мозаику из различных групп клеток: например, из одних участков мужского генитального диска образуется семяизвергательный канал, из других — различные элементы мужского полового органа, из третьих — анальные пластинки и задняя кишка. Следовательно, будущее разнообразие клеток детерминировано уже на личиночной стадии.

Неожиданные результаты были получены после трансплантации имагинальных дисков сразу во взрослых мух. Клетки неограниченно делились и разрастались. Если бы развитие этих имагинальных дисков происходило в нормальной личинке, то эти клетки прекратили бы деление с началом метаморфоза: под влиянием гормона насекомых экдизона они бы начали дифференцироваться в такие структуры взрослых особей, как щетинки, волоски, коготки и т. д. Неограниченный рост этих клеток, пересаженных в брюшко взрослых мух, продолжался более 6 лет. Поскольку муха дрозофила живет около месяца, размножающиеся клетки пересаживали в новую муху через каждые 2 недели. При этом клетки перенесли свыше 160 пересадок. Хотя трансплантанты жили во взрослых мухах годами, они сохранили свой

исходный эмбриональный характер и не дифференцировались. Если же извлечь немного трансплантанта и ввести в личинку, эти клетки претерпевали метаморфоз и нормально дифференцировались в структуры взрослого организма. При этом, если несколько лет назад для трансплантации были взяты крыловые имагинальные диски, при обратной трансплантации также формировалось крыло. Таким образом, состояние детерминации может воспроизводиться длительное время без каких-либо изменений. Очень продолжительное время это свойство детерминированных клеток передается благодаря своего рода «клеточной наследственности», или определенному состоянию ядерно-цитоплазматических отношений (наличие эпигенетических факторов).

В некоторых случаях нормальное состояние детерминированности в опытах Э. Хадорна резко изменялось. Очень редко из клеток генитального имагинального диска после длительного размножения в брюшке имаго формировались органы головы или конечности, т. е. клетки больше не дифференцировались в соответствии с детерминацией их предков — произошла трансдетерминация. Вновь приобретенное трансдетерминированное состояние в дальнейшем также передается за счет клеточной наследственности очень продолжительное время.

Явление трансдетерминации, так же как и результаты трансплантации ядер, полученные Дж. Гёрдоном, свидетельствуют, что детерминация не сопровождается необратимыми изменениями генов, тем более их потерей.

Очевидно также и то, что в основе любого детерминированного состояния лежит сбалансированная система ядерно-цитоплазматических отношений. Как может сформироваться такая система, лучше всего показывают результаты самого раннего развития.

Литература к разделу 15.4

Хадорн Э. Трансдетерминация клеток // Молекулы и клетки. Вып. 5. М.: Мир, 1970. С. 54–61.

Hadorn E. Transdetermination in cells // Sci. Amer. 1968. November. P. 110–120.

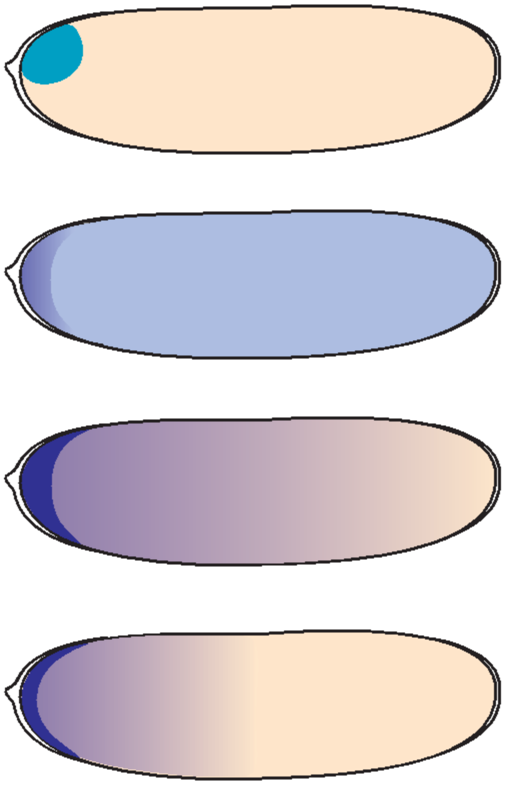
15.5. РАННЕЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ДРОЗОФИЛЫ

Еще в 1950-х гг. сформировалось представление о морфогенах как о веществах, индуцирующих образование определенных частей тела. Предполагали, что эти вещества диффундируют через ткань и их распределение диктует тот или иной путь развития клетки. Позднее теория морфогенов получила значительное развитие. По современным представлениям, морфоген выделяется из локального источника, и во время последующей диффузии в ткани образуется градиент его концентрации. В каждой группе клеток существует свой набор и концентрация морфогенов, т. е. своя информация о последующем развитии — это то, что генетики развития называют позиционной информацией.

Лучше всего изучены градиенты морфогенов, образующиеся в развивающемся яйце дрозофилы. Известно, что у дрозофил яйцо созревает в особой камере — фолликуле. Эта камера содержит ооцит — созревающее яйцо и 15 огромных питающих клеток, которые синтезируют продукцию и перекачивают ее в ооцит. В них активны гены с материнским эффектом, т. е. такие гены, которые функционируют в организме матери еще до оплодотворения яйца сперматозоидом, и информация от них передается в ооцит. Один из таких генов — *bicoid* (*bcd*). Самки, гомозиготные по мутации *bcd*, откладывают яйца, в которых нормальные эмбрионы не развиваются, даже если эти яйца оплодотворены спермием, содержащим нормальный аллель гена *bcd*. Совершенно очевидно, что весь продукт этого гена, необходимый для развития, синтезируется у матери и откладывается в яйце.

Оказывается, что белки, кодируемые генами, функционирующими в ходе созревания яйца, и транспортируемые туда из питающих клеток, распределяются по оси яйца, образуя градиенты, характерные для продуктов каждого гена. На рис. 15.9 показано распределение продукта гена *bcd* в пределах яйца. Он занимает строго определенный участок. Чтобы продукт *bcd* занял это место, требуется активность других генов. Мутации последних приводят к неправильному распределению продукта. Так, в нормальном яйце РНК гена *bcd* располагается локально (рис. 15.9, *а*). Однако у ряда мутантов распределение этой РНК в яйце сильно изменено: в результате мутации гена *exuperantia* РНК гена *bcd* более или менее равномерно распределена по всему яйцу с небольшим градиентом от переднего полюса к заднему. У мутантов *swallow* градиент этого морфогена выражен сильнее, т. е. распределение его ближе к нормальному: в передней части яйца выявлено большое скопление РНК *bcd*, и некоторое ее количество сосредоточено в остальной цитоплазме (рис. 15.9, *б*, *в*).

Рисунок 15.9



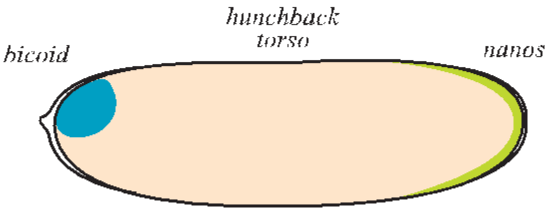
Распределение по длине яйца дрозофилы матричной РНК, считанной с гена *bicoid* в нормальной линии (синее пятно) (*а*), у мутантов *exuperantia* (*б*), *swallow* (*в*) и *staufen* (*г*) [Lawrence, 1992. P. 31]

Совсем близкое к норме, но все еще ненормальное распределение продукта *bcd* обнаружено у мутантов *staufen* (рис. 15.9, *г*): у них РНК *bcd* вообще не переходит в заднюю часть эмбриона.

Таким образом, РНК считывается с гена *bcd* еще в питающих клетках ооцитов в материнском организме и поступает в яйцеклетки. Затем с помощью продуктов других генов, в данном случае это гены *exuperantia, swallow* и *staufen*, РНК *bcd* занимает свойственное ей положение в цитоплазме яйца, т. е. создается определенный градиент концентрации данного морфогена. В случае мутации любого из трех перечисленных генов распределение РНК *bcd* изменяется, что приводит к серьезнейшим нарушениям развития.

Известно, что в яйцо поступает РНК, считанная со множества генов. Поскольку каждая из этих РНК еще и распределяется по своим местам в яйце в результате активности других генов, совершенно очевидно, сколь огромно число генов, участвующих в образовании яйца.

Рисунок 15.10



Распределение морфогенов по продольной оси яйца дрозофилы [Lawrence, 1992. P. 42]

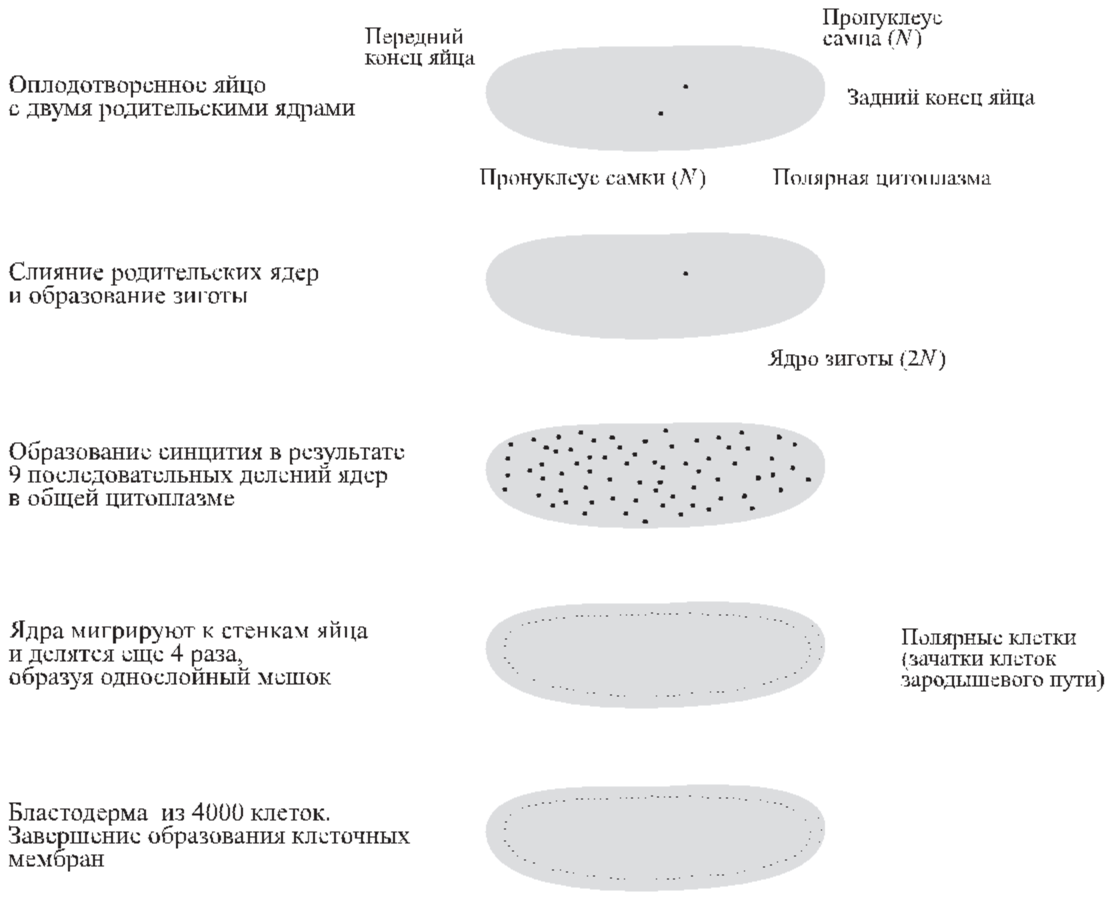
При созревании яйца в организме матери формируются четыре независимые системы: 1) передне-задний градиент белков (РНК) гена *bcd*; 2) градиент белка гена *nanos*, расположенного в задней части яйца и необходимого для развития брюшка мухи; 3) терминирующая система — градиент белка гена *torso*, расположенного на обоих полюсах яйца и необходимого для определения головной и хвостовой частей тела; 4) дорзо-вентральная система, которая зависит от активирования рецепторного белка, кодируемого геном *Toll* (часть из них показана на рис. 15.10).

После того как градиенты в яйце созданы, происходит оплодотворение и начинается дробление зародыша (рис. 15.11), в результате чего образуется однослойная бластодерма. Каждая клетка в ней занимает определенное положение по отношению к сформировавшимся градиентам, т. е. обладает определенной позиционной информацией. Морфогены, в том числе белки гена *bcd*, взаимодействуют с регуляторными участками генов, активирующихся у зигот (т. е. зиготических генов).

Понятно, что клетка, возникающая в области локализации морфогена *bcd*, будет испытывать его влияние, и развитие пойдет в определенном направлении. Если же клетка расположена в задней части эмбриона, где этого морфогена нет (см. рис. 15.9), она будет развиваться иначе. Таким образом, набор определенных белков, накопленных цитоплазмой к данной стадии развития, способен активировать определенный набор генов, благодаря чему либо поддерживается данное дифференцированное состояние, либо развитие продвигается дальше.

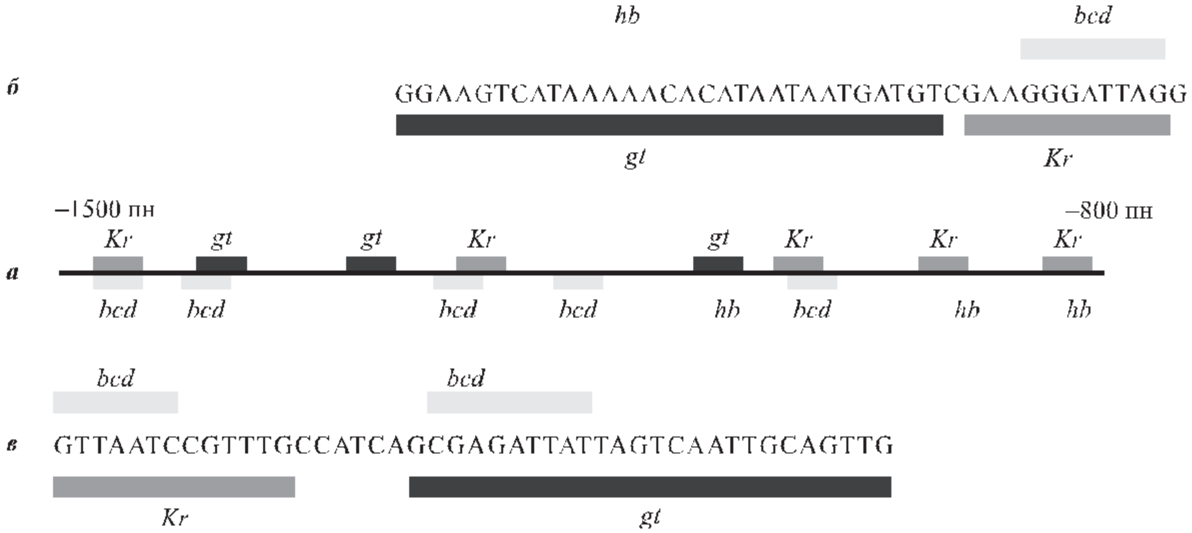
Каким образом белковый продукт одного гена может взаимодействовать с другим геном? Как известно, регуляторные части генов содержат специфические группы нуклеотидов (мотивы), имеющие сродство к определенным сочетаниям аминокислот (доменам) в молекулах

Рисунок 15.11



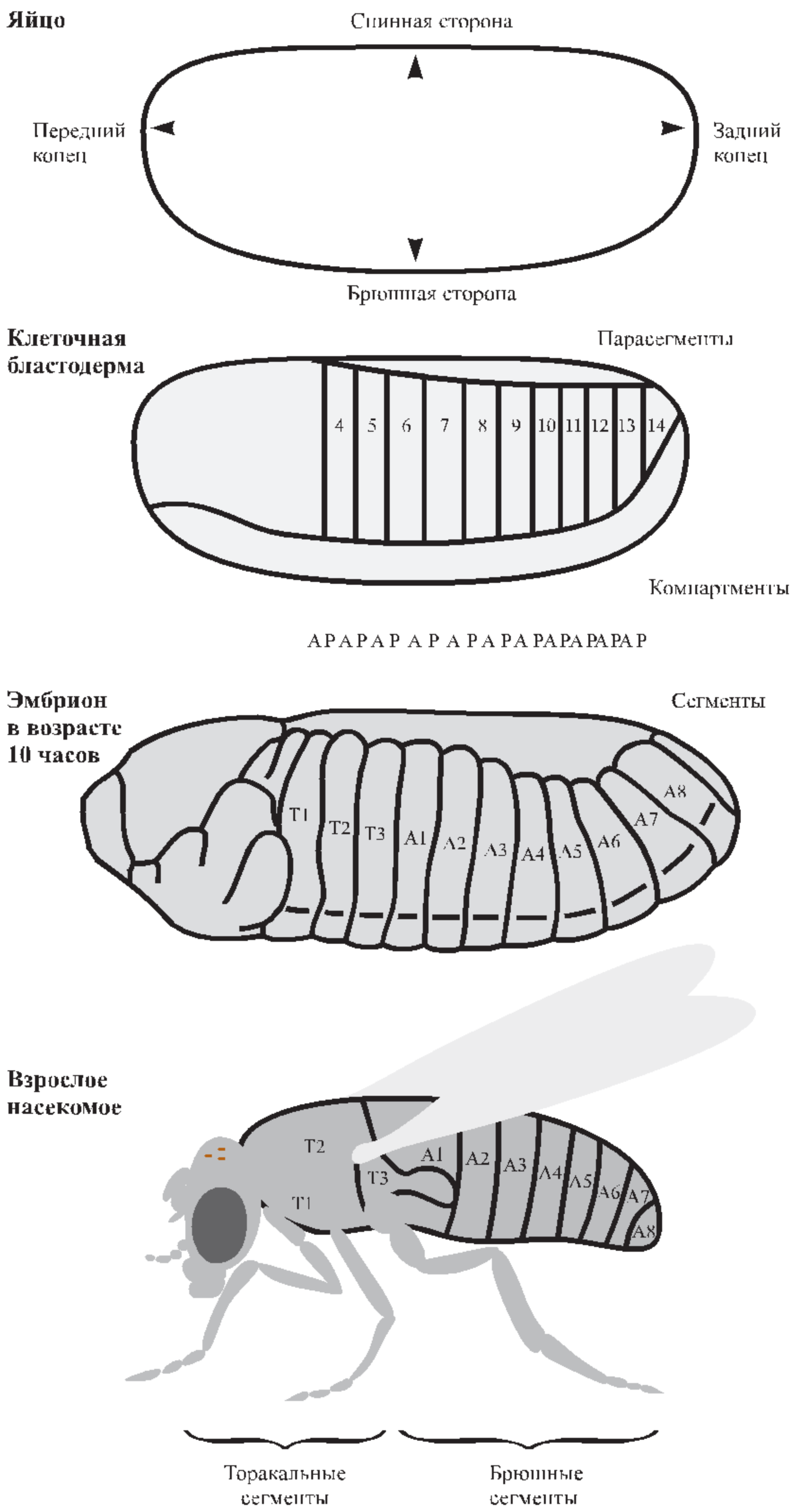
Эмбриональное развитие дрозофилы [Russell, 1998. P. 570]

Рисунок 15.12



Часть регуляторного района гена *eve* длиной 700 пн [Lawrence, 1992. P. 73]:
а — нить ДНК, на которой изображены участки посадки белков, кодируемых генами *Kr*, *gt*, *bcd* и *hb*;
б, *в* — последовательности нуклеотидов, связывающие данные белки

Рисунок 15.13



Расположение сегментов на разных этапах развития дрозофилы [Russell, 1998. P. 571].

Развитие дрозофилы определяется созданием передне-задних и спинно-брюшных градиентов в яйце, которые позволяют формироваться парасегментам в клеточной бластодерме, а также сегментам у эмбрионов и взрослых насекомых. Сегментация эмбрионов и имаго полностью идентичны

Рисунок 15.14

Типы генов сегментации у дрозофилы по их мутантному проявлению [Russell, 1998. P. 572]

белков. Посадка различных белковых факторов на соответствующие мотивы в регуляторных областях генов приводит к изменениям конфигурации ДНК (см. более подробно разд. 7.6) и началу транскрипции кодирующей части гена (если белок является активатором) или блокированию транскрипции (если белок является репрессором).

На рис. 15.12 изображен фрагмент (около 700 пн) регуляторной части гена *eve* (*even-skipped*), который контролирует развитие правильной сегментации тела дрозофилы. Видно, что мотивы нуклеотидов, связывающих активирующие белки генов *bcd* и *hb,* часто перекрываются с мотивами, на которые садятся белки, подавляющие транскрипцию (гены *Kr* и *gt*).

Эти данные свидетельствуют о том, что расположение белков, синтезированных в материнском организме, в определенной части яйца имеет первостепенное значение для процесса активирования генов в уже начавшем развитие эмбрионе. Ясно, что ген *eve* будет функционировать в той части эмбриона, в которой содержится много материнских белков — продуктов генов *bcd* и *hb,* и не будет функционировать в клетках, содержащих избыток продуктов *Kr* и *gt*.

После образования бластодермы и включения зиготических генов начинается формирование сегментального плана строения тела (рис. 15.13). Дело в том, что тело взрослой особи насекомых (имаго) состоит из ясно выраженных сегментов. В бластодерме сегментация выявляется лишь по продуктам определенных генов, сегменты четко не выражены и носят название парасегментов. На более поздних стадиях развития сегменты хорошо обособляются друг от друга и легко обнаруживаются (см. рис. 15.13). Эмбриональные сегменты дают начало сегментам взрослой мухи.

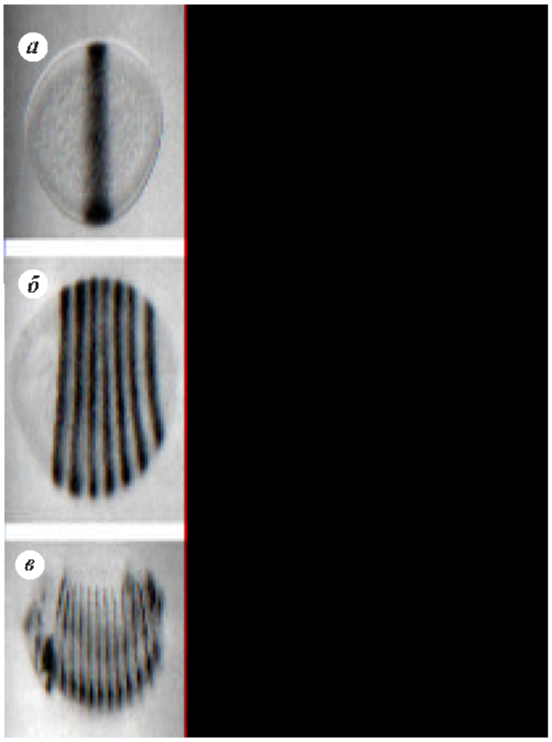
Сегментный тип организации свойствен не только двукрылым насекомым, но и многим другим животным. Даже у человека на некоторых этапах развития выявляются сомиты — первичные сегменты тела, на которые разделяется в ходе зародышевого развития мезодерма.

Сегменты у дрозофилы формируются в результате действия генов сегментации, 25 из которых охарактеризованы к настоящему времени. В результате мутаций этих генов изменяется число и расположение сегментов. Гены сегментации разделяются на три большие группы, выделяемые по их мутантному проявлению в фенотипе: *Gap*-гены, гены *pair-rule* и гены сегментной полярности. В составе этих групп установлены следующие гены [Корочкин, 1999. С. 94]:

Gap-гены	Гены *pair-rule*	Гены сегментной полярности
Kruppel	*hairy*	*engrailed*
knirp	*even-skipped*	*wingless*
hunchback	*runt*	*cubitus interruptus*
giant	*fushi tarazu*	*hedgehog*
tailless	*odd-paired*	*fused*
huckebein	*odd-skipped*	*armadillo*
	sloppy-paired	*patched*
	paired	*gooseberry*

Мутации группы *Gap* (от англ. gap — брешь) приводят к потере нескольких прилежащих сегментов тела, в результате чего в рисунке сегментации образуется пустота, или брешь (рис. 15.14). Мутации в группе генов *pair-rule* (или генов «правила парности») приводят к утрате одного и того же фрагмента

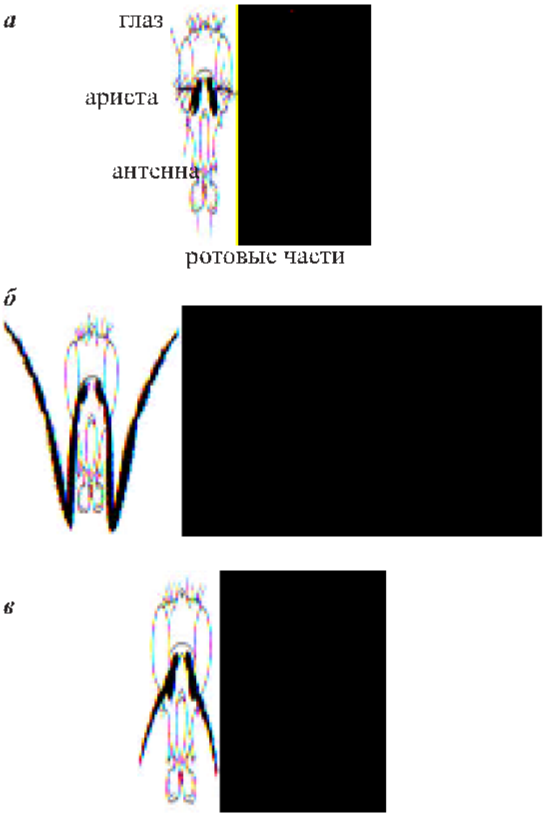
Рисунок 15.15



Иерархия действия генов сегментации. Последовательное подразделение эмбриона на широкие домены (*а*), парасегменты (б) и компартменты (*в*) [Gehring, 1998. P. 117]:

а — в результате экспрессии гена *Krüppel* (*Gap*-группа) на пребластодермальной стадии выявляется продукт этой экспрессии (РНК или белок) в виде темной полосы; *б* — экспрессия гена *fushi tarazu* на пребластодермальной стадии — образуется 7 парасегментов, в которых выявляется продукт этого гена (темные полосы); *в* — экспрессия гена *engrailed* из группы сегментной полярности на поздней стадии сегментации

Рисунок 15.16



Голова дрозофилы дикого типа (*а*) и гомеозисные превращения антенны (*б*) и аристы (*в*) в ногу в результате мутаций *Antennapedia* и *aristapedia* соответственно

в каждом втором сегменте. У мутантов по генам сегментной полярности определенные части сегментов заменены структурами, представляющими зеркальные отражения прилежащих половин сегментов.

Какова иерархия действия этих генов? Гены из группы *Gap* активируются морфогенами, кодируемыми генами с материнским эффектом и располагающимися в яйце по градиенту. Действие *Gap*-генов приводит к формированию широких доменов в эмбрионе (рис. 15.15), каждый из которых будет потом развиваться в несколько более мелких сегментов. Затем включаются гены группы *pair-rule* и сегментной полярности.

После того как завершено формирование сегментации, вступают в действие гомеозисные гены — большой класс генов, которые контролируют развитие какой-то части тела из определенного сегмента. В результате гомеозисной мутации из данного сегмента развивается какая-то другая часть тела (дополнение 15.3, рис. 15.16). Среди гомеозисных генов наиболее известны *Bithorax-complex (BX-C)* и *Antennapedia-complex (Ant-C).*

У дрозофилы личинки и имаго имеют ярко выраженные сегменты: один головной, три грудных и восемь брюшных. Каждый сегмент имаго содержит уникальный набор дифференцированных морфологических структур. Например, мезоторакальный сегмент несет пару крыльев и пару ног, метаторакальный — пару ног и пару гальтеров — особых булавовидных

Дополнение 15.2

Нобелевская премия 1995 г. была присуждена Э. Льюису (E. B. Lewis), К. Нюссляйн-Волхард (C. Nüsslein-Volhard) и Э. Вишаусу (E. F. Wieschaus) за открытие генетического контроля раннего эмбрионального развития.

Рисунок 15.17

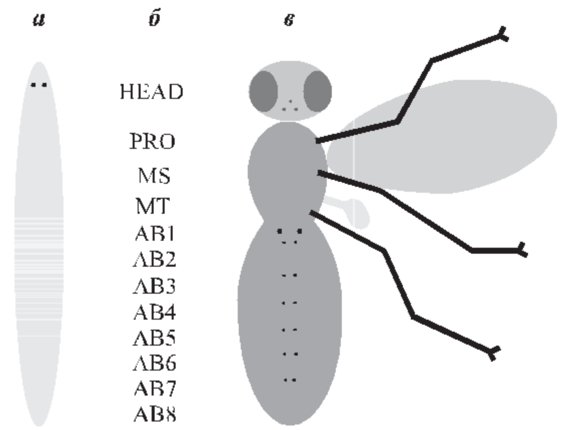


Схема сегментального строения личинки (*а*) и взрослой мухи дрозофилы (*в*) [Lewis, 1978].

На обобщенной схеме (*б*) видно, что как личинка, так и взрослая муха имеют общий принцип сегментации. Они имеют головной сегмент (HEAD), три грудных сегмента (PRO — проторакальный, T1; MS — мезоторакальный, T2; MT — метаторакальный, T3), а также 8 брюшных (AB1–AB8). Каждый из сегментов как у личинки, так и у имаго имеет свой набор органов, отличающий данный сегмент от остальных

Рисунок 15.18

Эдвард Льюис
(1918 — 2004)

образований, помогающих удерживать равновесие в полете. Характерный набор можно найти и на сегментах личинки (рис. 15.17).

По мнению американского ученого Э. Льюиса (рис. 15.18), мухи эволюционировали из насекомых, имевших четыре крыла, а насекомые, в свою очередь, произошли из членистоногих, имевших множество ног. В ходе эволюции у мух должны были сформироваться несколько групп генов: подавляющих развитие ног на брюшных сегментах многоножкоподобных предков, а также подавляющих развитие второй пары крыльев. Должна была также появиться группа генов, отвечающих за формирование новых структур: гальтеров и брюшных сегментов.

Одним из генов, влияющих на эти процессы, является *BX-C*. В ходе своих экспериментов Э. Льюис полностью удалил ген *BX-C* с помощью небольшой делеции. Без этого гена эмбрион развивается до определенной стадии и затем гибнет.

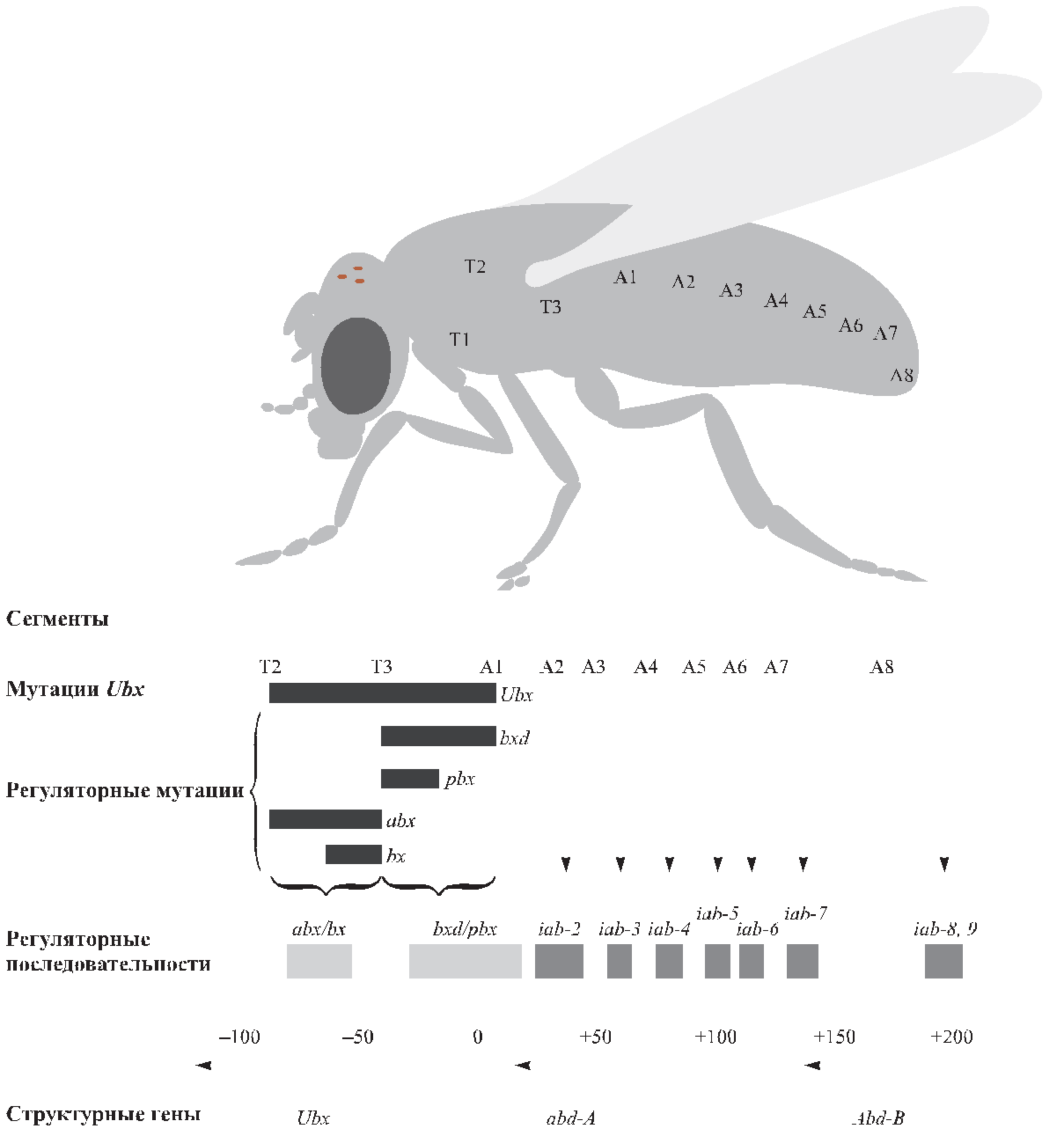
Погибший эмбрион можно было рассмотреть. Результаты оказались поразительными. Эмбрион имел очень характерную морфологию: у него был проторакальный сегмент, а все остальные — мезоторакальные (см. рис. 15.17). Если бы этот организм остался жить и вырос во взрослую муху, то она бы имела 10 пар крыльев и 10 пар ног. Э. Льюис сделал вывод о том, что функция гена *BX-C* заключается в инактивации генов, формирующих ноги и крылья во всех последующих после второго торакального сегментах, и в развитии всех структур на брюшных сегментах.

В дальнейших экспериментах оказалось, что комплекс *BX-C* содержит три различных гена: *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* (рис. 15.19). Каждый из них контролирует формирование определенной группы сегментов. Мутации этих генов заставляют все последующие сегменты формироваться подобно одному из предыдущих, и генетический порядок мутаций грубо соот-

Дополнение 15.3

Термин «гомейозис» предложил в 1894 г. У. Бэтсон еще до переоткрытия законов Г. Менделя. Он дал широкое определение для группы явлений варьирования признаков, в результате которого «нечто изменяется в похожесть на что-то другое». У особи вместо одних частей тела появляются другие, которые в норме должны быть расположены в другом сегменте тела. Первую гомеозисную мутацию — *bithorax* у дрозофилы открыл К. Бриджес в 1915 г. В 1926 г. Е. И. Балкашина открыла вторую гомеозисную мутацию — *aristapedia*, и еще через 5 лет вновь К. Бриджес открыл *proboscipedia* [Lewis, 1994].

Рисунок 15.19



Организация комплекса генов *BX*-C [Russell, 1998. P. 577].
Три гена — *Ubx, abd-A* и *Abd-B* — занимают участок ДНК длиной 300 тпн, считываются справа налево. Над картой ДНК показаны регуляторные мутации, которые влияют на развитие различных сегментов мухи

ветствует пространственному расположению органов по оси тела (рис. 15.20). Так, если все три гена удалены (*Ubx* , *abd-A* , *Abd-B*), нормально развиваются только первый торакальный (T1) и девятый брюшной (A9) сегменты, контролируемые другими генами, все остальные сегменты (T3 и все брюшные) развиваются как T2.

Если ген *Ubx* сохраняется, но повреждаются *abd-A* и *Abd-B*, нормально развиваются все грудные сегменты, а все брюшные представлены самым первым — A1.

При повреждении гена *Abd-B* нормально развиваются все грудные сегменты, затем брюшные A1, A2 и A3, а все остальные сформированы как сегмент A4 (см. рис. 15.20).

Рисунок 15.20

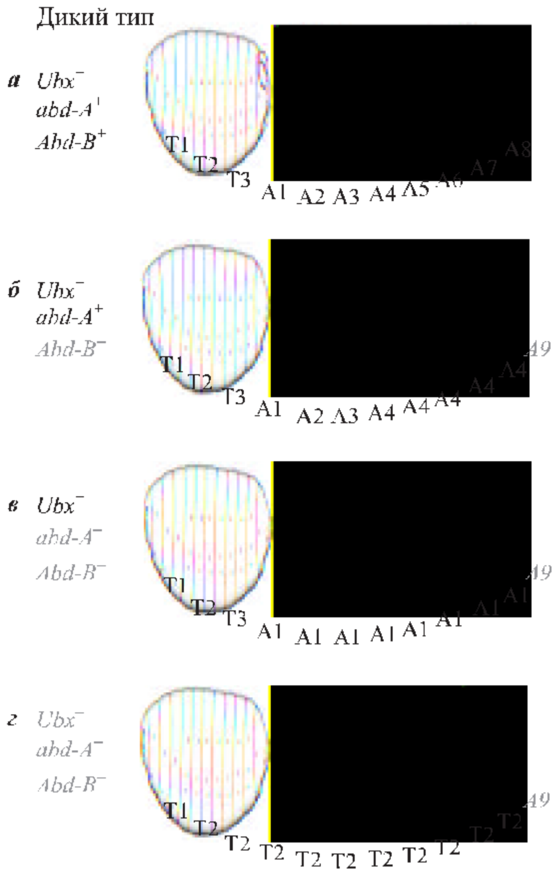


Схема нарушений дифференцировки в результате мутаций генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* [Lawrence, 1992. P. 112]:

а — все три гена работают нормально, у эмбриона нормально развиты грудные (T1–T3) и брюшные сегменты (A1–A8); *б–г* — нарушения сегментации в результате мутирования одного, двух или всех трех генов

В молекулярно-генетических экспериментах выяснили, что все три гена комплекса *BX-C*, а также ген *Antp* имеют гомологичные друг другу участки, т. е. последовательности нуклеотидов в них фактически одинаковы (более 90 % сходства). Последовательность длиной 180 пн, которая имела наибольшую гомологию, назвали гомеобоксом, а соответствующий ему фрагмент белковой молекулы длиной 60 аминокислотных остатков — гомеодоменом.

К настоящему времени найдены сотни генов, обладающих гомеобоксом: у человека, мышей, птиц, лягушек, червей, жуков. Фактически все представители животного мира, проходящие хотя бы на некоторых этапах развития стадию сегментированного зародыша, имеют гены, обладающие гомеобоксом. А у дрозофилы обнаружено свыше 20 генов, содержащих в своем составе гомеобокс. 180 пн гомеобокса кодируют фрагмент полипептида длиной в 60 аминокислот, который скручен в 4 α-спирали, каждая из которых отделена от другой наклоном оси вращения. Третья из этих спиралей помещается в большую бороздку ДНК, опознает последовательность нуклеотидов и связывается с ними (см. рис. 7.42, *а*).

Такими структурными особенностями обладают ДНК-связывающиеся белки — факторы транскрипции. Процессы взаимодействия нуклеотидов ДНК и аминокислот белка — фактора транскрипции организованы так, что определенная последовательность нуклеотидов связывается только с определенной последовательностью аминокислот. Поэтому нуклеотиды в гомеодомене и расположены в такой консервативной последовательности у представителей разных типов, классов, родов и видов животных. Например, из 60 аминокислот в гомеодомене мухи дрозофилы и лягушки (ксенопуса) 55 оказались одинаковыми.

Рассмотренные выше данные несомненно свидетельствуют о том, что развитие — это процесс последовательного включения все более и более усложняющихся генных систем. При этом продукты одних генов находят специальные посадочные площадки в регуляторных районах других генов, садятся на них и включают эти гены в активное функционирование. И так — сплошная последовательность включений и выключений генов.

Литература к разделу 15.5

Жимулёв И. Ф. Действие генов в раннем развитии дрозофилы // Соросовский образовательный журн. 1998. № 7. С. 30–34.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 75–120.

Gehring W. J. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New Haven; London: Yale University Press, 1998. 236 p.

Lawrence P. A. The making of a fly. The genetics of animal design. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 232 p.

Lawrence P. A., Struhl G. Morphogens, compartments and pattern: lessons from *Drosophila* // Cell. 1996. Vol. 85. P. 951–961.

Lewis E. B. Homeosis: the first 100 years // Trends in Genetics. 1994. Vol. 10. P. 341–343.

Lewis E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* // Nature. 1978. Vol. 276. P. 565–570.

Russell P. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 569–579.

15.6. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ

В результате дифференциальной активности генов формируются различные дифференцированные клеточные линии, а на их основе — ткани и органы.

В широком смысле этого слова дифференцировкой называют комплекс изменений, вовлеченных в прогрессивные расхождения в структуре и функциях клеток организма. При этом в каждой линии клеток дифференцировка приводит к постоянному сужению спектра транскрипции.

Лучше всего формирование клеточных линий прослежено на примере *C. elegans* (дополнение 15.4). Организм взрослых гермафродитов состоит только из 959 соматических клеток, у самцов 1031 клетка. Число зародышевых клеток у обоих полов варьирует. Число соматических клеток фиксировано, и их можно подсчитать непосредственно под микроскопом. Кроме того, прямо в живом организме можно проследить клеточные деления и судьбу каждой дочерней клетки от зиготы до конкретного ор-

Рисунок 15.21

Лимфатические клетки **374**
Эндотелиальные клетки **1031**
Слюнная железа **17**
Щитовидная железа **584**
Околощитовидная железа **46**
Гладкая мускулатура **127**
Молочная железа **696**
Поджелудочная железа **1094**
Селезенка **1094**
Надпочечники **658**
Желчный пузырь **788**
Большой сальник **163**
Тонкий кишечник **297**
Плацента **1290**
Простата **1283**
Скелетная мышца **735**
Белые кровяные клетки **2164**

Мозг **3195**
Глаз **547**
Кость **904**
Жировая ткань **581**
Тимус **261**
Пищевод **76**
Легкие **1887**
Сердце **1195**
Печень **2091**
Эритроцит **8**
Тромбоцит **22**
Толстый кишечник **879**
Почка **712**
Яичник **504**
Семенник **370**
Матка **1859**
Кожа **620**
Эмбрион **1989**
Яичко **1232**
Синовиальная оболочка **813**

Число генов, вовлеченных в развитие и функционирование органов и тканей человека [Сойфер, 1998]

Дополнение 15.4

Нематода *Caenorhabditis elegans* была выбрана в качестве модельного объекта биологии развития Сиднеем Бреннером (Sidney Brenner) в 1963 г., когда они с Френсисом Криком почувствовали, что большинство классических проблем молекулярной биологии уже решено и что в будущем нужно браться за более сложные биологические проблемы: «Мы должны двигаться к другим проблемам биологии, которые являются новыми, загадочными и яркими». Бреннер выбрал проблему развития червя, а Крик — проблемы человеческого мозга. Почему именно червя? Бреннер хотел получить в качестве объекта небольшой организм, развитие которого можно было бы изучать с помощью аналитических методов генетики микроорганизмов. *C. elegans* — маленькая, около одного миллиметра длиной, свободноживущая почвенная нематода, питающаяся преимущественно бактериями. Ее жизненный цикл составляет 3 дня. Она производит несколько сот потомков. В лабораториях живет на чашках Петри с агаром, несущим газон *E. coli*. Размер генома *C. elegans* составляет 8×10^7 пн, т. е. вдвое меньше, чем у дрозофилы [Gehring, 1998. P. 56–57].

гана. Каждая клеточная линия (ткань, орган) характеризуется определенным набором генов, активируемых в процессе ее развития.

По результатам исследований в рамках програмы «Геном человека» удалось примерно установить число генов, вовлеченных в формирование и функционирование отдельных органов и тканей человеческого тела (рис. 15.21).

Литература к разделу 15.6

Сойфер В. Н. Международный проект «Геном человека» // Соросовский образовательный журн. 1998. № 12. С. 4–11.

Gehring W. J. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New Haven; London: Yale University Press, 1998. P. 54–92.

15.7. ГОМОЛОГИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ

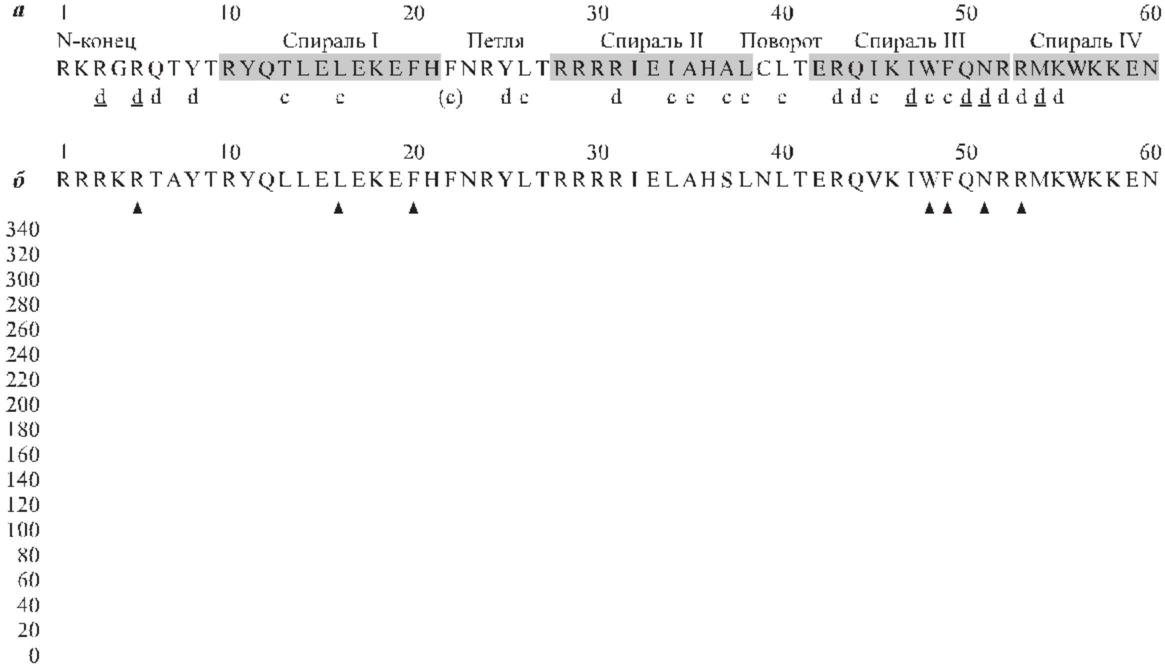
Рассмотрим несколько примеров. После открытия гомеобокса у дрозофилы эту структуру стали обнаруживать у множества представителей Metazoa от губок до позвоночных и человека, а также у высших растений, и уже к 1995 г. было описано 346 последовательностей гомеодомена. Если принять за основу аминокислотную последовательность гомеодомена из гена *Antennapedia*, то окажется, что в семи позициях частота встречаемости одной и той же аминокислоты составляет более 95 % (рис. 15.22).

Семейство генов с гомеобоксами у дрозофилы называют *HOM*-семейством, у млекопитающих — *HOX*. Оказалось, что в *HOM*- и *HOX*-семействах гены и располагаются, и считываются в одинаковом порядке (рис. 15.23).

Следует оговориться, что такое расположение гомеозисных генов не абсолютно. У близкого к *D. melanogaster* вида — *D. virilis* в одном кластере находятся гены *Ubx* и *Antp*, но средний ген из комплекса *BX-C – Abd-A* расположен отдельно [Allmen von et al., 1996].

Описано огромное разнообразие типов строения и функционирования глаз у животных (рис. 15.24). У дрозофилы мутация *eyeless* (*ey*) полностью прекращает развитие глаза (см. рис. 4.3). У мыши и крысы мутации *Small eye* (*Sey*), а у человека — *Aniridia* останавливают развитие глаз и эмбриона в целом.

Рисунок 15.22

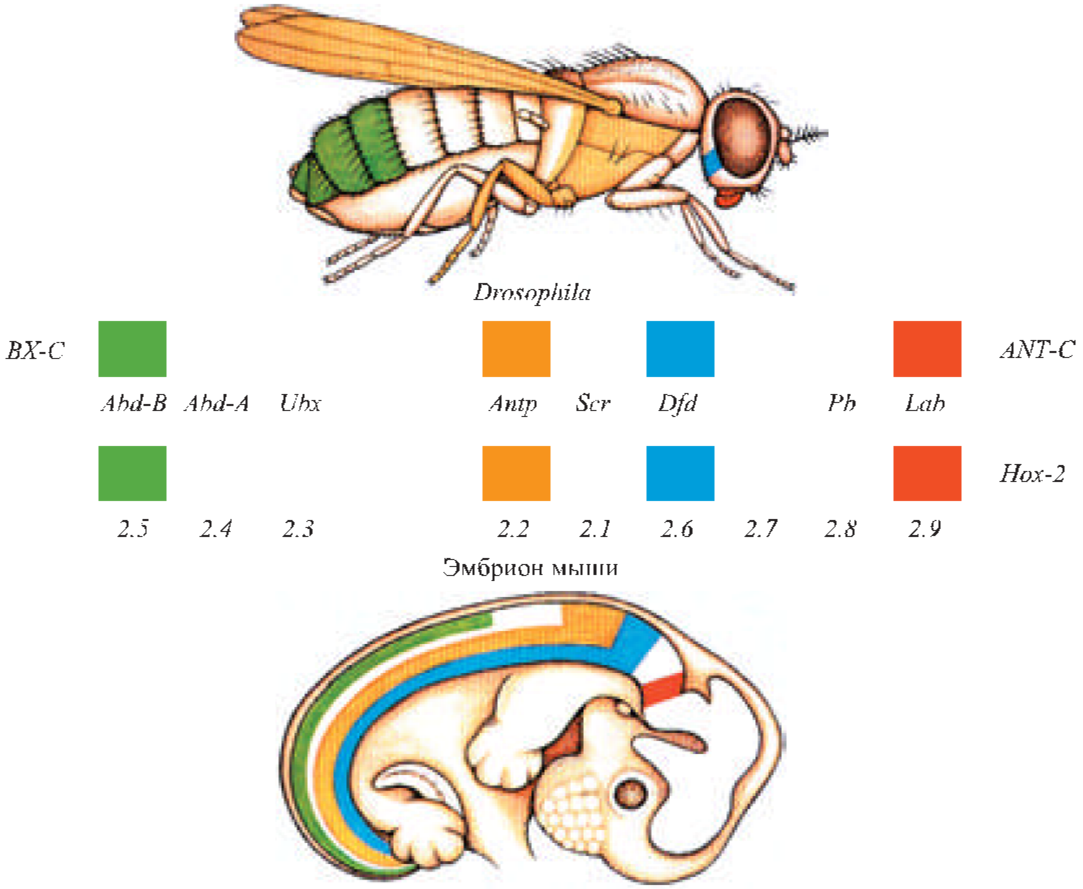


Консервативность организации гомеодоменов [Gehring, 1998. P. 180]:

а — структура гомеодомена гена *Antennapedia* у *D. melanogaster* (1–60 — аминокислоты, входящие в гомеодомен, c — аминокислотные остатки, вовлеченные в формирование гидрофобной сердцевины, d — аминокислоты, участвующие в процессе связывания с ДНК, d — аминокислоты, непосредственно контактирующие с ДНК); *б* — консенсус гомеодомена и встречаемость в данном положении аминокислоты, присущей гомеодомену гена *Antennapedia*.

Высота столбиков соответствует числу гомеодоменов, имеющих эту аминокислоту в данном положении

Рисунок 15.23



Колинеарность расположения гомеозисных генов и картины их экспрессии у дрозофилы и мыши [DeRobertis et al., 1990].

Гены, обладающие гомеобоксом, контролируют развитие столь различных организмов, как дрозофила и мышь. Гомологичные гены и части тела у обоих видов закрашены одинаковым цветом

Рисунок 15.24

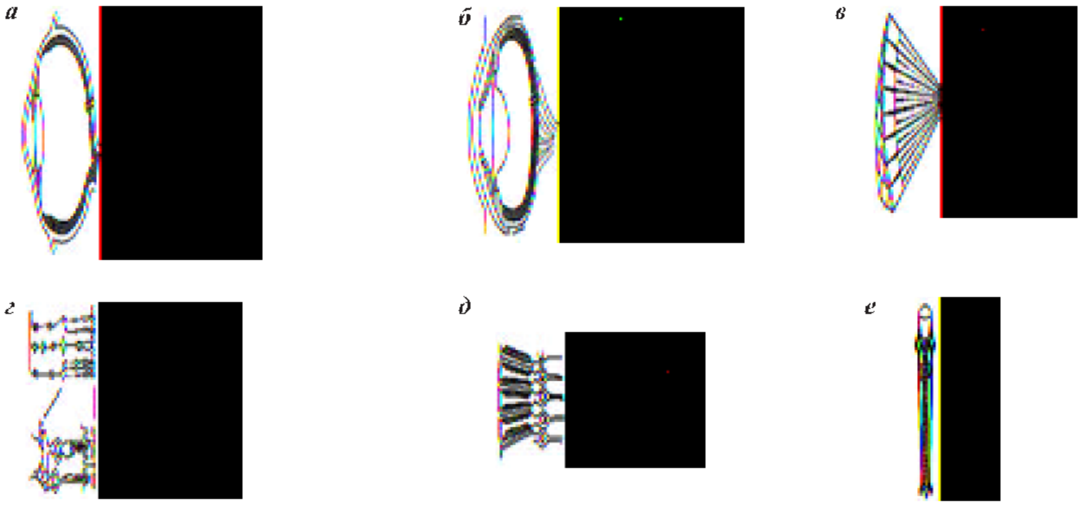


Схема строения глаза [Halder et al., 1995b]:

а, г — человека, *б, д* — кальмара, *в, е* — дрозофилы;
г, д — разрез сетчатки, *е* — продольный срез через один омматидий

Оказалось, что белки, кодируемые этими генами, являются факторами транскрипции. Степень гомологии этих генов по аминокислотам достигает 97 %. В разделе 7.6.3 приводится удивительный факт: при встраивании в геном дрозофилы гена *Sey* из генома мыши у мух формируются глаза, типичные для насекомых.

Как было недавно установлено, в развитие глаза вовлечено около 2500 генов, и весь каскад генов прямо или опосредованно контролируется одним главным, или мастер-геном. Именно мастер-гены, котролирующие развитие на ранних этапах эмбриогенеза, и имеют максимальную гомологию.

Литература к разделу 15.7

Allmen G. von et al. Splits in fruitfly *Hox* gene complexes // Nature. 1996. Vol. 380. P. 116.

DeRobertis E., Oliver G., Wright C. Homeobox genes and the vertebrate body plan // Sci. Amer. 1990. Vol. 263. P. 26–33.

Gehring W. J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye // Genes to Cells. 1996. Vol. 1. P. 11–15.

Gehring W. J. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New Haven; London: Yale University Press, 1998. P. 180–209.

Halder G., Callaerts P., Gehring W. J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila* // Science. 1995a. Vol. 267. P. 1788–1792.

Halder G., Callaerts P., Gehring W. J. New perspectives on eye evolution // Current Opin. Genet. Developm. 1995b. Vol. 5. P. 602–609.

Quiring R., Walldorf U., Kloter U., Gehring W. J. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Anitridia* in humans // Science. 1994. Vol. 265. P. 785–789.

15.8. АПОПТОЗ (ГЕНЕТИЧЕСКИ ЗАПРОГРАММИРОВАННАЯ СМЕРТЬ КЛЕТКИ)

Большинство, если не все клетки животных обладают способностью к саморазрушению в результате активирования внутренних генетических программ самоубийства в тех случаях, когда данные клетки более не требуются организму или если они серьезно повреждены. Исполнение этой программы смерти часто связано с характерными морфологическими и биохимическими изменениями, и эта форма клеточной смерти называется апоптозом (термин происходит от греческого слова, описывающего растения, теряющие листья).

В ходе апоптоза ядро и цитоплазма конденсируются и умирающая клетка часто фрагментируется на апоптозные тела, окруженные мембранами, которые затем подвергаются фагоцитозу и перевариваются макрофагами или соседними клетками.

Апоптоз следует отличать от обычной некротической гибели клеток. Последняя, как правило, вызывается острым повреждением клетки, которое характеризуется быстрым ее набуханием и лизисом. Апоптоз часто сопровождается активацией нуклеаз, расщепляющих хромосомную ДНК сначала на большие (50–300 тпн), а потом на все более мелкие фрагменты.

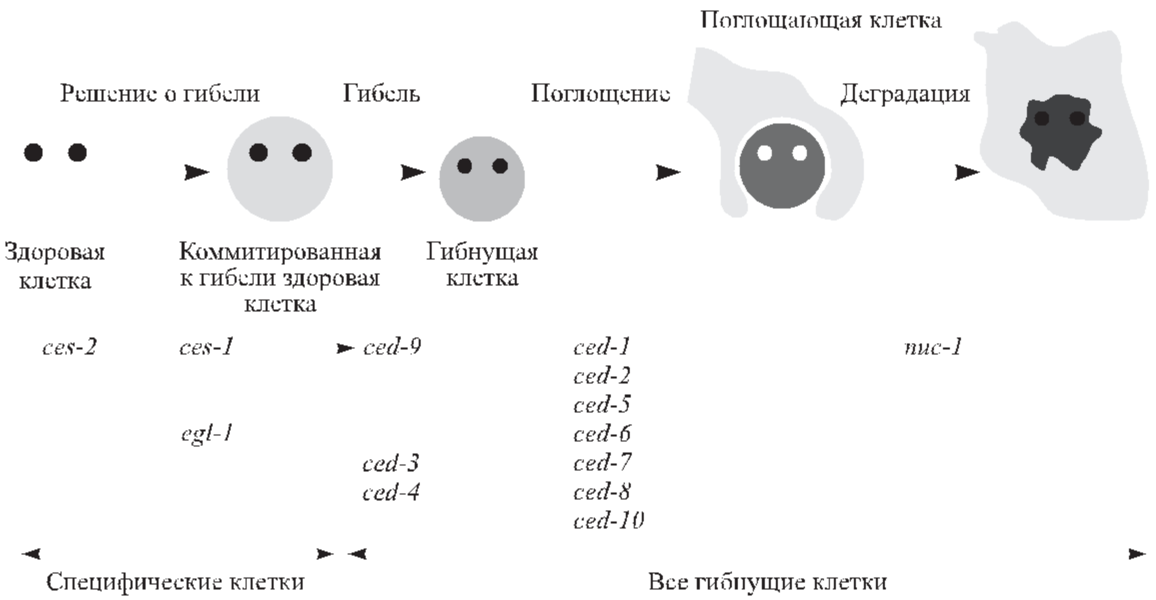
Как сейчас широко признается, апоптоз играет важную роль в формировании организма, регулировании числа клеток в организме, как защитный механизм для удаления ненужных или потенциально опасных клеток, таких как самоактивирующиеся лимфоциты, клетки, инфицированные вирусами, или опухолевые клетки.

Лучше всего генетический контроль процесса апоптоза изучен у нематоды *C. elegans*. Программированная смерть клеток у этого вида проходит четыре этапа (рис. 15.25). Сначала формируется «решение» о том, будет клетка жить или должна погибнуть, затем происходит гибель клетки, ее поглощение фагоцитами или другой клеткой и деградация поглощенных остатков клетки.

Выявлено 14 генов, участвующих в этом процессе у нематоды. Три гена — *ced-3*, *ced-4* и *ced-9* (*ced* — cell death defective) — вовлечены в процесс гибели всех клеток. Активность первых двух требуется для того, чтобы произошла гибель клеток, ген *ced-9* необходим, чтобы защитить клетки, которые должны выжить в ходе развития. Этот ген кодирует белок Bcl-2, принадлежащий к семейству белков — регуляторов клеточной смерти. Белки, видимо, взаимозаменяемы: экспрессия гена *Bcl-2* человека ингибирует апоптоз у нематоды. Эти данные свидетельствуют о значительном консерватизме по крайней мере части системы клеточного самоубийства. Оказалось также, что активность антиапоптозного белка p35, выделенного из бакуловируса, защищает от апоптоза клетки насекомых, нематод и нейроны млекопитающих (рис. 15.26).

Каким образом регулируется программа апоптоза и каким образом только определенные клетки отбираются для гибели? Апоптоз кон-

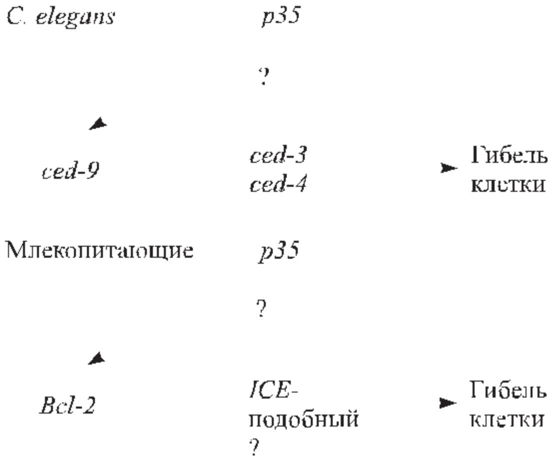
Рисунок 15.25



Генетический путь программированной клеточной гибели у *Caenorhabditis elegans* [Steller, 1995]: → — позитивная регуляция, ⊣ — негативная регуляция.

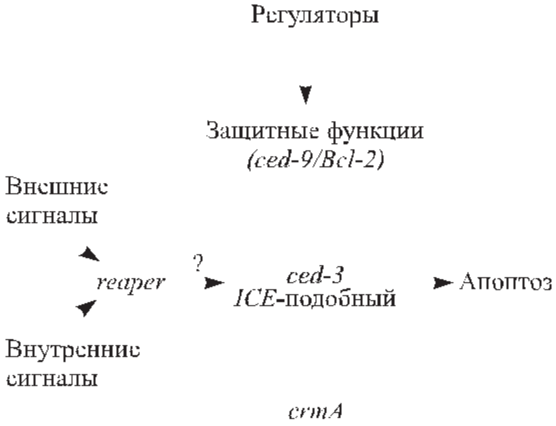
Было выделено 14 генов, которые на различных стадиях контролируют этот процесс. Гены, которые влияют на решение погибнуть, активны только в малом количестве клеток. В противоположность этому гены, вовлеченные в реализацию всех последовательных стадий клеточной смерти, являются общими для всех соматических клеток этого организма. Активность генов *edc-3* и *ctd-4* стимулирует гибель клеток, в то время как активность гена *ced-9* предотвращает это событие, «спасает» клетку от гибели. Установлены эпистатические отношения между этими генами

Рисунок 15.26



Сходство некоторых этапов апоптоза у *C. elegans* и млекопитающих [Steller, 1995]

Рисунок 15.27



Гипотетическая модель конвергенции сигналов по программе апоптоза [Steller, 1995]

тролируется многими сигналами (рис. 15.27). Один из них был найден у дрозофилы. В результате генетического анализа был обнаружен ген *reaper* (*rpr*) (в переводе с англ. — «жнец» или «косец»), который способен аккумулировать внешние и внутренние сигналы. Делеции, удаляющие ген *rpr*, подавляют апоптоз в ответ на любой стимул, известный до сих пор. У эмбрионов дрозофилы мРНК гена *rpr* специфически выявляется в клетках, которые обречены на гибель. Начало экспрессии гена на 1–2 ч опережает появление первых морфологических признаков апоптоза. Этот ген быстро индуцируется в ответ на облучение рентгеновскими лучами. Кроме того, искусственная активация гена *rpr* приводит к гибели клеток, которые обычно не подвержены апоптозу. Ген *rpr* кодирует небольшой полипептид из 65 аминокислот, который не имеет существенного сходства с другими известными белками.

Литература к разделу 15.8

Агол В. И. Генетически запрограммированная смерть клетки // Соросовский образовательный журн. 1996. № 6. С. 20–24.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. С. 182–195.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide // Science. 1995.Vol. 267. P. 1445–1449.

Глава 16
ОСНОВЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ

16.1. ПОНЯТИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ

Иммунная система спасает животных от неминуемой гибели вследствие инфекций. Любое позвоночное животное, родившееся с сильными повреждениями иммунной системы, вскоре погибнет, если его полностью не изолировать от каких бы то ни было инфицирующих агентов.

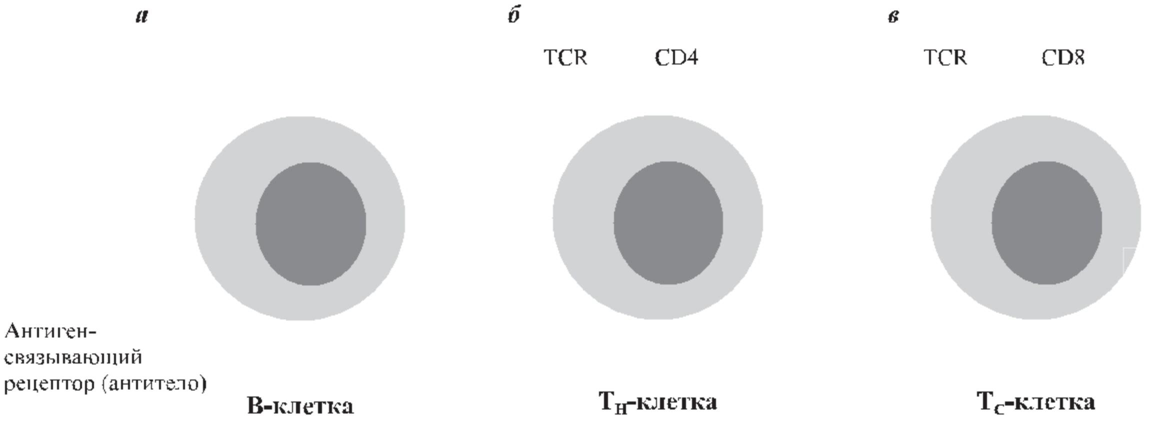
Иммунность (от лат. immunitas — свободный от чего-либо) означает нечувствительность к данному виду возбудителей болезней, а иммунитет — способность организма защищать собственную целостность. Область генетики, которая изучает генетические механизмы иммунного ответа, называют иммуногенетикой.

Иммунитет — защита организма от инфекции или, в более широком смысле, реакция организма на чужеродные макромолекулы, микроорганизмы и клетки. Защита осуществляется с помощью двух систем — неспецифического (врожденного, естественного) и специфического иммунитета. Эти две системы могут рассматриваться и как две стадии единого процесса защиты организма. Неспецифический иммунитет выступает как первая линия защиты. Система врожденного иммунитета действует на основе реакции воспаления и фагоцитоза. Она реагирует только на корпускулярные агенты (микроорганизмы, занозы) и на токсические вещества, разрушающие клетки и ткани, вернее, на корпускулярные продукты этого разрушения.

Вторая и наиболее сложная система — приобретенного иммунитета — основана на специфических функциях лимфоцитов — клеток крови, распознающих чужеродные макромолекулы (антигены) и реагирующих на них либо непосредственно, либо выработкой защитных белковых молекул — антител.

Антигеном (генератором антител) может быть не всякое вещество. Оно должно быть чужеродным, макромолекулярным (с мол. массой более 10–12 кДа) и иметь устойчивую хи-

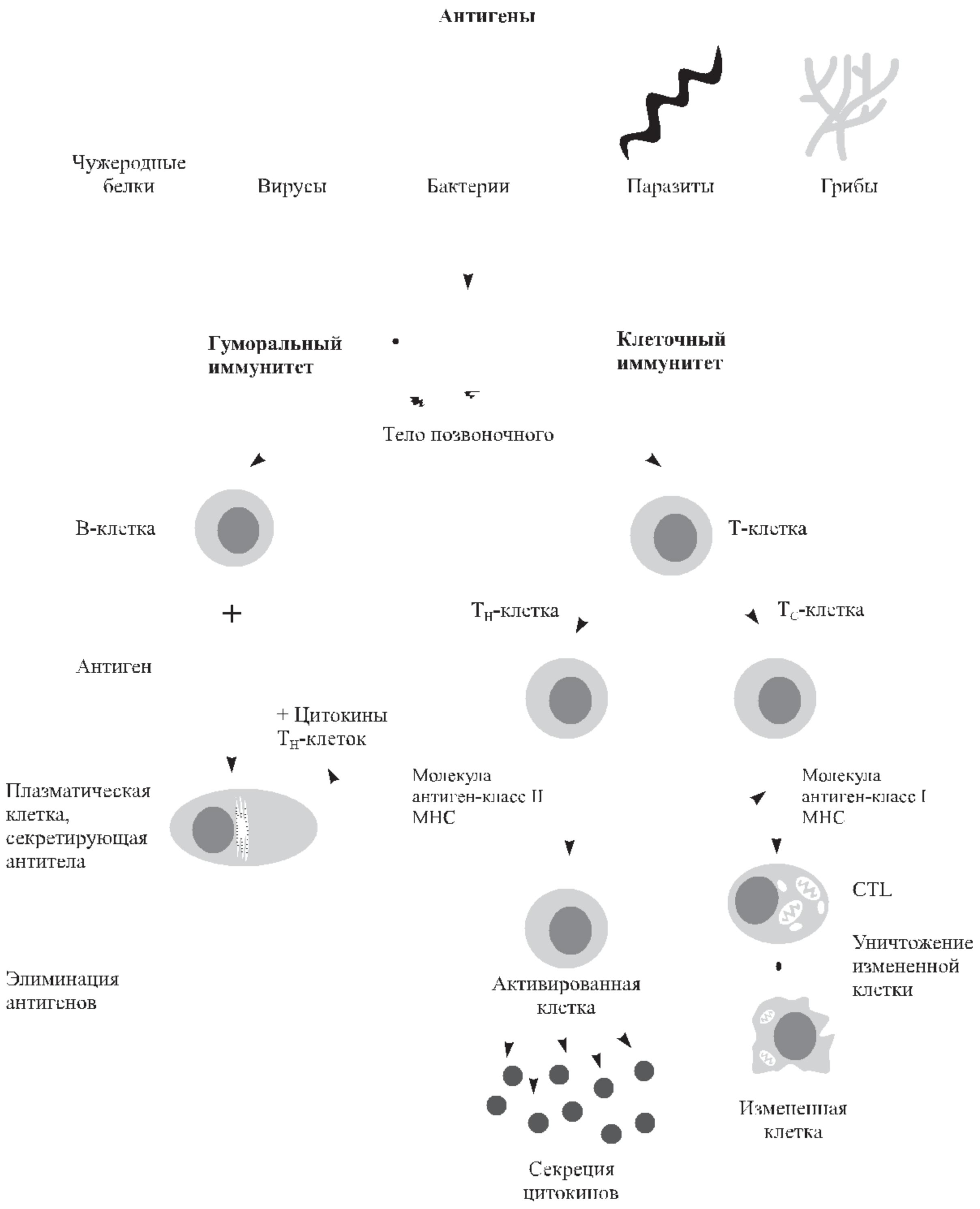
Рисунок 16.1



Типы лимфоцитов [Kuby, 1994. P. 11].

В-клетка имеет примерно 10^5 молекул антител, расположенных на мембране; все молекулы антител на поверхности клетки имеют одну и ту же антигенную специфичность и могут непосредственно связываться с антигеном (*а*). Т-клетки, несущие CD4, распознают только антигены, связанные с молекулами МНС класса II (*б*). Т-клетки, несущие CD8, распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса I (*в*). Клетки $CD4^+$ функционируют в качестве хелперов (T_H), а клетки $CD8^+$ функционируют в качестве цитотоксических клеток (T_C). Оба типа Т-клеток содержат около 10^5 идентичных молекул антиген-связывающих рецепторов (TCR) на одну клетку

Рисунок 16.2



Две составляющие иммунной системы [Kuby, 1994. P. 13].

В ходе осуществления гуморального иммунитета происходит взаимодействие В-клеток с антигеном и последующая дифференцировка В-клеток в плазматические клетки, синтезирующие антитела. Секретируемые антитела связывают антигены и облегчают их удаление из организма. Система клеточного иммунитета включает различные субпопуляции Т-клеток, которые опознают антиген, связанный с белком MHC класса I. T_H-клетки отвечают на появление антигена продукцией цитокинов. T_C-клетки отвечают на антиген дифференцировкой в цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), которые обеспечивают убийство измененной антигеном клетки (например, клетки, инфицированной вирусами)

Таблица 16.1. Некоторые биологические характеристики иммуноглобулинов человека [Галактионов, 1997]

Свойство	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Обозначение					
H-цепи	μ	γ	α	δ	ε
L-цепи	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ или λ
Молекулярная формула	$(\mu_2\kappa_2)_5$	$\gamma_2\kappa_2$	$(\alpha_2\kappa_2)_n$	$\delta_2\kappa_2$	$\varepsilon_2\kappa_2$
Число доменов H-цепи	5	4	4	4	5
Молекулярная масса (кДа)	900	160	170	185	185

мическую структуру. К типичным антигенам относятся белки и полисахариды.

Приобретенный иммунитет характеризуется четырьмя свойствами, которые неразделимы и всегда проявляются вместе:

1. Организм отличает свои антигены от чужих.

2. Способность отличать запоминается. Это так называемая иммунологическая «память».

3. «Память» специфична, запоминается контакт лишь с определенным антигеном. Специфичность этого запоминания очень высока.

4. Иммунный ответ на чужеродную макромолекулу можно избирательно подавить, если ввести ее в развивающийся организм внутриутробно или в первые часы после рождения. Такое подавление реакции на белок называется толерантностью (терпимостью).

Система приобретенного иммунитета имеется в организме человека и других животных (рыбы, земноводные, пресмыкающиеся, птицы, млекопитающие). Она широко используется для вакцинации, т. е. введения ослабленных или убитых микроорганизмов или выделенных из них макромолекул, вызывающих иммунную реакцию на эти микроорганизмы. Вакцинация является основным способом предупреждения таких заболеваний, как оспа, туберкулез, полиомиелит, сибирская язва и многие другие. Приобретенный иммунитет составляет основное препятствие для пересадки органов (сердце, почки, печень) и тканей (кожа) от одного человека другому. Для преодоления этого барьера несовместимости пользуются препаратами, подавляющими иммунную систему.

Каким образом возникает иммунитет? У человека существуют триллионы лимфоцитов — белых кровяных клеток. Они находятся в кровеносном русле, в лимфоидных органах (тимус, лимфоузлы, селезенка и аппендикс) и в лимфе (бесцветная жидкость в лимфатических сосудах, соединяющих лимфоузлы).

Существуют две составляющие иммунной системы, каждая из которых ассоциирована с лимфоцитами определенного типа: гуморальный и клеточный иммунитет. Лимфоциты, созревающие в тимусе (вилочковой железе), называются Т-лимфоцитами, в отличие от В-лимфоцитов, развивающихся в костном мозге (рис. 16.1). Клеточный иммунитет обеспечивается Т-клетками, а гуморальный — как В-, так и Т-лимфоцитами. Клеточный иммунитет опосредуется преимущественно специфическими Т-клетками — цитотоксичными Т-лимфоцитами, или «киллерами» (CTL), и направлен против клеток, несущих на своей поверхности чужеродные антигены.

Активирование как гуморальной, так и клеточной ветви иммунной системы требует цитокинов, продуцируемых T_H-клетками, которые в свою очередь активируются только в том случае, если антиген появляется в комплексе с молекулами белков, кодируемых *MHC* (локус гистосовместимости), на поверхности специализированных клеток, называемых антигенпредставляющими клетками (APC). Эти клетки (макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки) поглощают антигены и затем выделяют часть антигена в комплексе с молекулой MHC на своей мембране. Затем T_H-клетки опознают антиген, связанный с молекулой MHC на поверхности антигенпредставляющих клеток.

Гуморальная ветвь иммунной системы включает в себя взаимодействие В-клеток с антигеном, последующую их пролиферацию и дифференцировку в плазматические клетки, секретирующие антитела (рис. 16.2). Когда антигены связываются с антителами, эти комплексы тем или иным способом удаляются из организма.

Несмотря на то что антигены обычно имеют большие размеры, они опознаются В- или Т-лимфоцитами, поскольку антитела, расположенные на этих клетках, связываются с не-

Дополнение 16.1

В 1972 г. Дж. М. Эдельман (G. M. Edelman) и Р. Р. Портер (R. R. Porter) получили Нобелевскую премию за исследование химической структуры антител.

большими участками антигена, называемыми антигенными детерминантами или эпитопами. В-клетки распознают эпитоп самостоятельно, в то время как Т-клетки — только если он расположен на поверхности антигенпредставляющей клетки в комплексе с молекулой МНС. Часть антигена, взаимодействующая с белками МНС, называется агритопом (рис. 16.3).

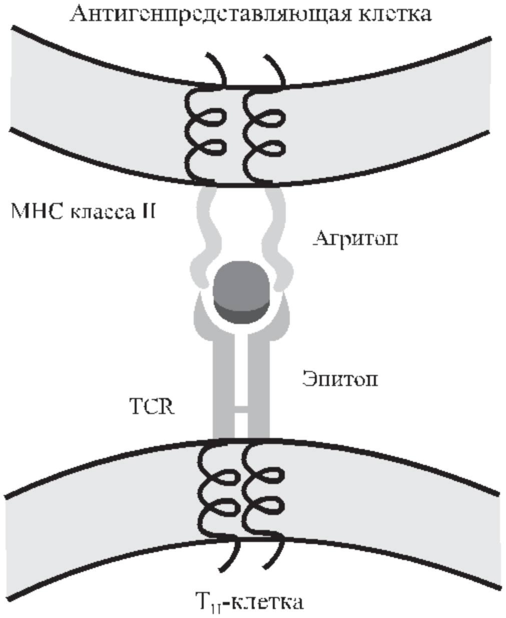
Как устроены антитела и рецепторы лимфоцитов? Очевидно, что их структура должна быть необычной, так как они строго специфически распознают громадное множество различных антигенов: любой чужеродный белок, полисахарид или синтетическую молекулу, вообще в природе не встречающуюся. Антитела являются иммуноглобулинами.

У млекопитающих, включая человека, известны пять классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Каждый класс обладает своими структурными и биологическими свойствами (табл. 16.1).

Иммуноглобулины всех классов построены по общему плану. Это можно проиллюстрировать на примере молекулярной организации IgG (рис. 16.4).

Антитело состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей: Н (heavy — тяжелых) с молекулярной массой примерно 50 000 Да и L (light — легких) с молекулярной массой

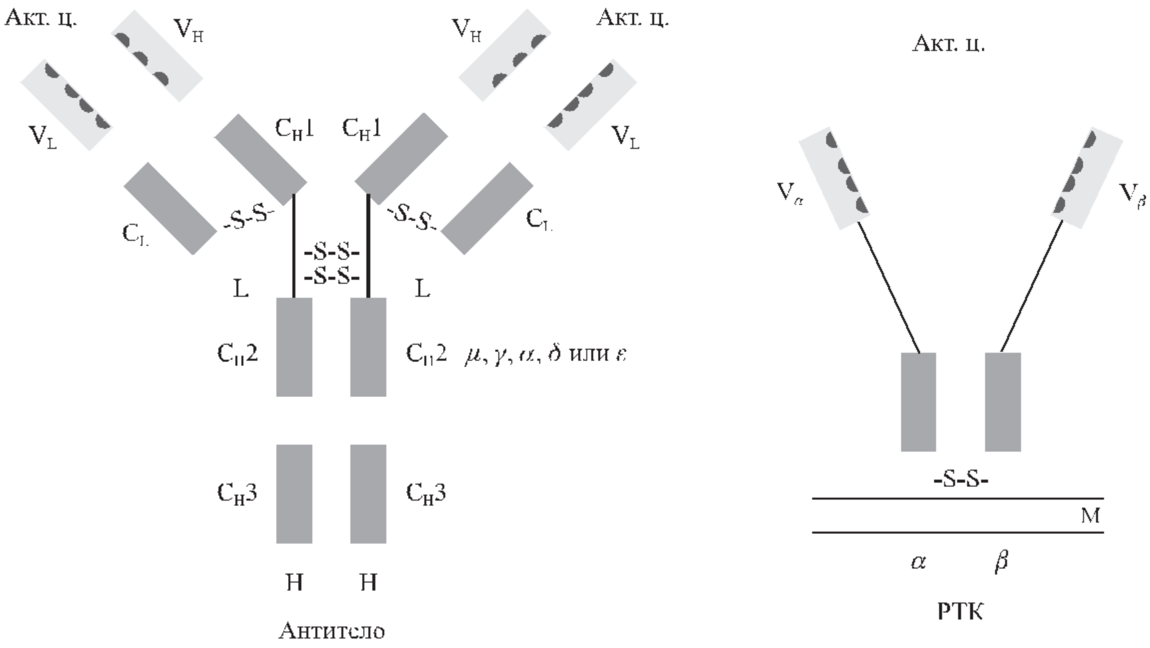
Рисунок 16.3



Схематическое изображение комплекса из антигена, рецептора Т-клетки (TCR) и молекулы МНС [Kuby, 1994. P. 97].

Антигены, которые опознаются Т-клетками, имеют два участка контактов: агритоп, взаимодействующий с молекулами МНС класса I или II, и эпитоп, взаимодействующий с рецептором Т-клетки

Рисунок 16.4

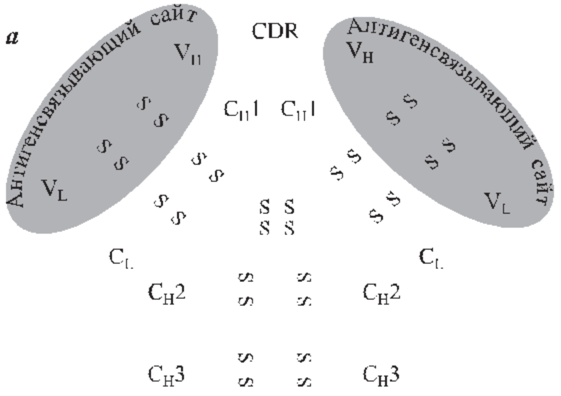


Строение антител и рецепторов Т-клеток (РТК) [Абелев, 1996; Kuby, 1994. P. 113].

Н и L — тяжелая и легкая цепи антител; V_L и V_H — вариабельные районы соответствующих цепей; V_α и V_β — вариабельные районы α- и β-цепей; Акт. ц. — активные центры антител и РТК. Прямоугольники — повторяющиеся сходные звенья (домены) в структуре полипептидных цепей; М — клеточная мембрана

Рисунок 16.5

а



б

Структура антигенсвязывающего участка в молекуле антитела [Сингер, Берг, 1998. С. 284, 286]: *а* — комплекс антигена и антитела (указаны вариабельная и константная области легкой (V_LC_L) и тяжелой (V_HC_H) цепей, а также отдельные домены константных областей тяжелой цепи (C_H1, C_H2, C_H3) и антигенсвязывающие сайты в вариабельных областях и CDR); *б* — структура активного центра в молекуле антитела

около 25 000 Да. Цепи соединены друг с другом ковалентными (дисульфидными) связями. Рецептор лимфоцитов, в отличие от антител, — гетеродимер, состоящий из пары различных цепей — α и β с молекулярной массой около 50 000 Да, соединенных между собой одной дисульфидной связью. В основе структуры иммуноглобулинов лежит сходное повторяющееся звено (домен) примерно из 110 аминокислот, свернутых в глобулы. Каждый домен в молекуле антитела или рецептора Т-клеток (РТК) выполняет свою биологическую функцию, а наиболее важную из них — распознавание и связывание с антигеном — осуществляют концевые домены (см. рис. 16.4). Пара концевых доменов (один из Н-цепи, другой из L-цепи, а в РТК — один из β-цепи, другой из α-цепи) образует активный центр, уникальную по структуре полость, распознающую в молекуле антигена небольшие дискретные участки из 4–8 аминокислот (рис. 16.5).

Эти участки антигена подходят к структуре активного центра, «как ключ к замку», образуя прочные нековалентные связи антигена с антителом. Разные антитела (и РТК) отличаются друг от друга структурой активных центров. На молекулярном уровне эти различия определяются первичной структурой концевых доменов Н- и L-, α- и β-цепей, т. е. последовательностью аминокислот в них. Участки Н- и L-цепей (равно как α и β), образующие «стенки» активного центра, носят название вариабельных (V) районов. Остальная часть молекул постоянна — это константный (С) район. Вариабельных районов среди молекул антител тысячи, константных — единицы. Главная функция вариабельных районов — образование активных центров антител и РТК. Разнообразие активных центров очень велико, не менее 10^7–10^8, что вполне достаточно для более или менее специфического распознавания любого произвольно взятого антигена. Таким образом, структура антител, а точнее, их активных центров обеспечивает узнавание любого чужеродного белка или полисахарида, попавшего в организм.

Как же осуществляется контроль синтеза полипептидных цепей, один из районов которых постоянно варьирует при переходе от одного антитела (или РТК) к другому (вариабельный, V-район), а остальные строго постоянны (константные, С-районы)? Эта задача решается благодаря уникальному генетическому механизму — независимому генетическому контролю V- и С-районов, составляющих одну полипептидную цепь, и сборке гена, контролирующего вариабельный район, из фрагментов в процессе созревания лимфоцита.

Загадка сосуществования константных и вариабельных участков в одной и той же полипептидной цепи была разрешена в конце 1970-х гг. С. Тонегавой. Он показал, что фрагменты ДНК, кодирующие V- и С-участки, расположенные в виде непрерывных последовательностей в геноме миеломы мыши, пространственно разобщены у эмбрионов или в сперматозоидах мыши.

Гены, контролирующие структуру одной полипептидной цепи антитела или РТК, объ-

Дополнение 16.2

В 1987 г. Сузуму Тонегава (Susumu Tonegava) получил Нобелевскую премию за открытие генетических принципов формирования разнообразия антител.

Рисунок 16.6

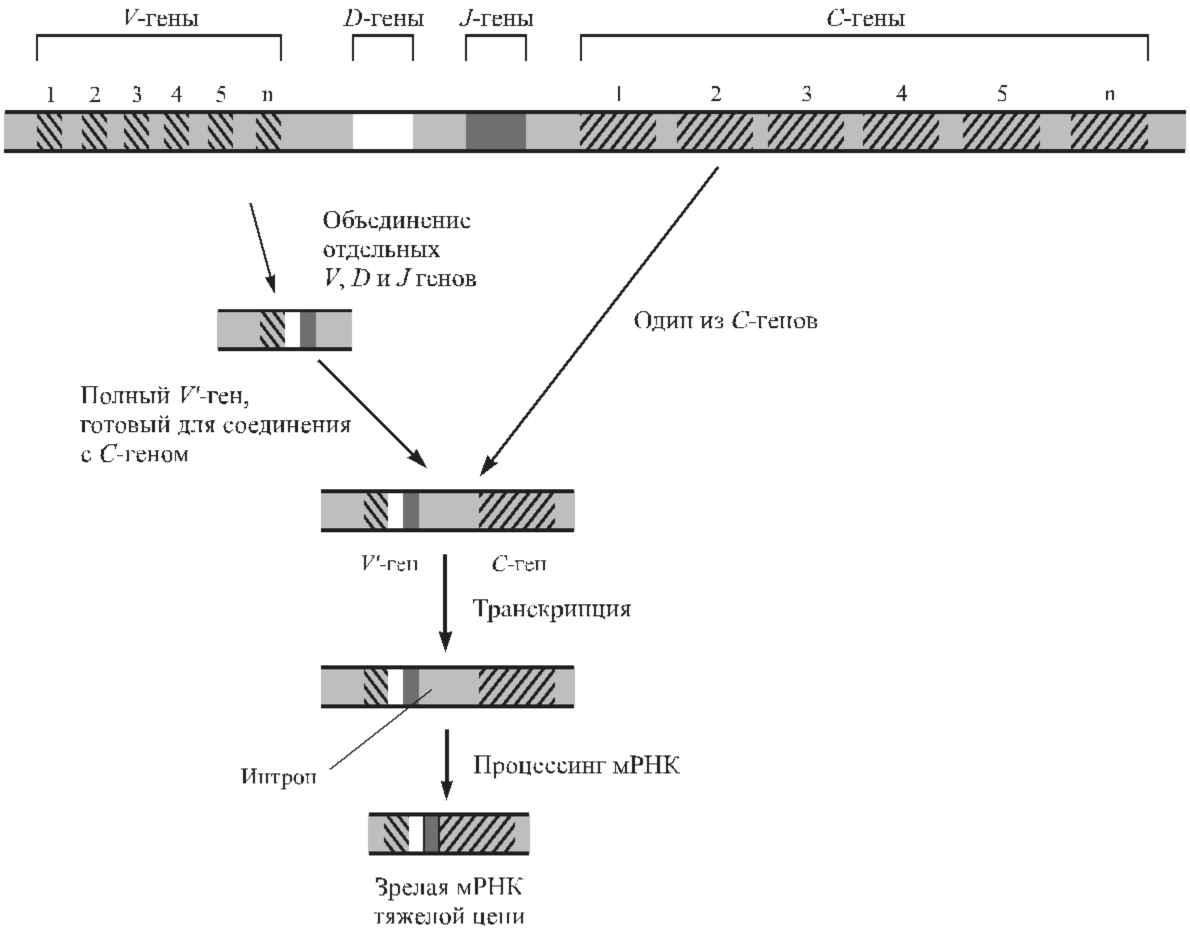
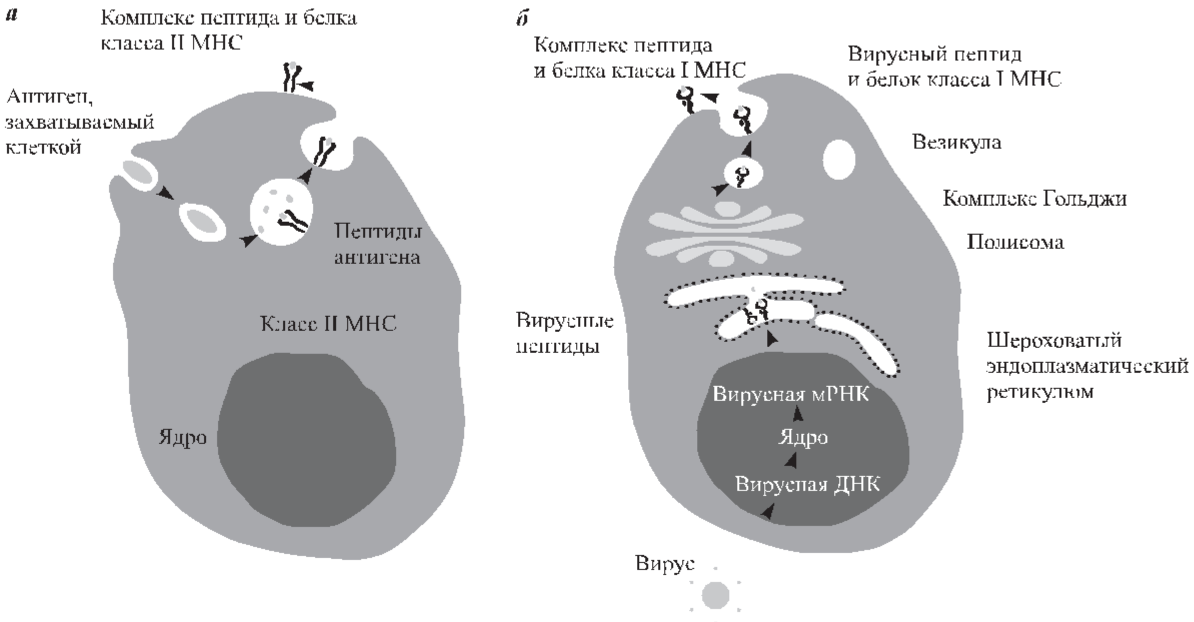


Схема объединения генов, кодирующих тяжелую цепь антител.

Отобранные *D*- и *J*-сегменты перемещаются из различных районов хромосомы и формируют вариабельный ген, который соединяется с одним из константных *C*-генов. Интрон между вариабельной и константной последовательностями удаляется из РНК-транскрипта, в результате чего образуется молекула мРНК

единены в семейства, расположенные в одном участке хромосомы. При этом гены, соответствующие V-районам, «разорваны» на 2 или 3 фрагмента — основной *V'* и один или два дополнительных — *D* и *J* (D — от англ. diversity — разнообразие, J — от joining — соединяющий). *V'*-фрагмент гена контролирует первые 95 аминокислот в V-доменах, *D* — от 2 до 10 и *J* — от 5 до 15. *V'*-фрагментов в геноме недифференцированных лимфоцитов много — от 50 до 1000 для разных цепей, и все они отличаются друг от друга по своей структуре. *D*-гены представлены несколькими десятками копий, а *J* — единичными последовательностями, причем каждая из них уникальна. В процессе созревания лимфоцита фрагменты объединяются на случайной основе в *V'DJ*-ген (рис. 16.6), причем число возможных сочетаний равно произведению числа *V'*-, *D*- и *J*-генов. Для различных цепей антител или РТК число таких сочетаний варьирует от тысячи до десятков тысяч. Кроме того, в процессе сборки возможны ошибки и изменения в последовательности нуклеотидов объединяющихся фрагментов, что резко увеличивает число возможных комбинаций. Дальнейшее разнообразие активных центров возникает за счет объединения вариабельных районов в пары цепей, составляющих этот центр. Таким образом, благодаря сборке *V*-гена из фрагментов и образованию активных центров из разных цепей, создается 10^7–10^8 уникальных по своей структуре участков молекулы антител, среди которых всегда найдутся способные взаимодействовать с любым произвольно взятым антигеном. Все это разнообразие и составляет репертуар антител. Следует подчеркнуть, что этот репертуар возникает до встречи с антигеном и независимо от антигена и что большая часть антител не потребуется в течение всей жизни особи.

Рисунок 16.7



Процессинг экзогенных (*а*) и эндогенных (*б*) антигенов [Kuby, 1994. P. 16]

Эти антитела присутствуют на поверхности лимфоцитов, образуя там распознающие антиген рецепторы. Чрезвычайно важно, что на поверхности одной клетки находятся антитела одной и той же специфичности. Один лимфоцит может синтезировать антитела только одной специфичности, не отличающиеся друг от друга по структуре активного центра. Это формулируется как принцип «один лимфоцит — одно антитело».

Каким же образом антиген, попадая в организм, вызывает усиленный синтез именно тех антител, которые специфично реагируют только с ним? Ответ на этот вопрос дала теория селекции клонов, предложенная австралийским исследователем Ф. Бернетом. Согласно этой теории, высказанной в 1957 г. и полностью подтвержденной последующими экспериментами, одна клетка синтезирует лишь один тип антител, которые локализуются на ее поверхности. Роль антигена заключается лишь в том, чтобы найти клетку, несущую на своей мембране антитело, реагирующее именно с ним, и активировать эту клетку. Активированный лимфоцит вступает в деление и дифференцировку. В результате из одной клетки возникает 500–1000 генетически идентичных клеток (клон), синтезирующих один и тот же тип антител, способных специфически распознавать антиген и соединяться с ним. В результате дальнейшей дифференцировки лимфоцит превращается в клетку, не только синтезирующую данное антитело, но и секретирующую его в окружающую среду. Таким образом, функции антигена — найти соответствующий ему лимфоцит, вызвать его деление и дифференцировку в клетку, секретирующую антитела. В этом и заключается суть иммунного ответа: в селекции нужных клонов и их стимуляции к делению. Динамика первичного и повторного ответов, согласно теории Бернета, — это отражение динамики размножения клонов клеток, продуцирующих антитела к данному антигену. Толерантность — утрата клона клеток вследствие их контакта с антигеном в процессе созревания лимфоцита.

Для того чтобы чужеродный белковый антиген опознавался Т-клетками, он должен деградировать на небольшие пептиды, формирующие комплексы с молекулами белков класса I или II, кодируемых генами *MHC*. Это превращение белков в МНС-связанные пептидные фрагменты называется процессингом антигена (рис. 16.7).

В результате процессинга пептиды в комплексе с белками МНС появляются на мембра-

Дополнение 16.3

Нобелевская премия 1960 г. была присуждена Ф. М. Бернету (F. M. Bernet) и П. Б. Медавару (P. B. Medawar) за открытие приобретенной иммунологической толерантности.

Рисунок 16.8

Комплекс у мыши

	H-2							*Tla*
Класс MHC	I	II		III		I	I	I
Район	*K*	*IA*	*IE*	*S*		*D*	*Qa*	*Tla*
Продукты генов	H-2K	IA $\alpha\beta$	IE $\alpha\beta$*	Белки комплемента	Фактор некроза опухоли TNF-α TNF-β	H-2D H-2L	Qa	Tla, Qa

Комплекс у человека

	HLA							
Класс MHC	II			III		I		
Район	*DP*	*DQ*	*DR*	*C4, C2, BF*		*B*	*C*	*A*
Продукты генов	DP $\alpha\beta$	DQ $\alpha\beta$	DR $\alpha\beta$	Белки комплемента	Фактор некроза опухоли TNF-α TNF-β	HLA-B	HLA-C	HLA-A

Структура главных локусов гистосовместимости у мыши и человека [Kuby, 1994. P. 210]

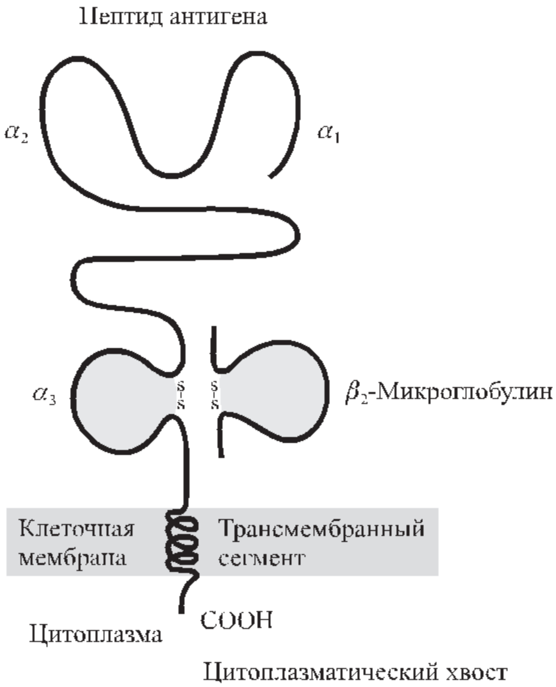
не так называемых антигенпредставляющих клеток (макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки). Затем Т-клетки опознают этот комплекс антигена и МНС-белков, причем CD4 T_H-клетки связываются с клетками, содержащими на мембране белки класса II МНС, а CD8 T_C-клетки — класса I МНС.

У человека белки классов I и II локуса *MHC* кодируются генами, расположенными в кластере *HLA* хромосомы 6, у мыши — в *H-2* комплексе хромосомы 17 (рис. 16.8).

Молекулы МНС класса I состоят из тяжелой α-цепи, соединенной нековалентно с легкой цепью — β_2-микроглобулином (рис. 16.9).

α-Цепь — это трансмембранный белок размером 45 кДа, кодируемый локусом *MHC* класса I (гены *A*, *B* и *C* локуса *HLA* у человека и *K*, *D* локуса *H-2* у мыши). β_2-Микроглобулин является инвариантным белком размером 12 кДа и кодируется не в локусе *MHC*, а в другой хро-

Рисунок 16.9



Строение молекул МНС класса I [Kuby, 1994. P. 215].

Домены α_3- и β_2-микроглобулинов имеют характерную для иммуноглобулинов структуру

Дополнение 16.4

В 1980 г. Б. Бенасерраф (B. Benacerraf), Ж. Доссе (J. Dausset) и Дж. Снелл (G. Snell) получили Нобелевскую премию за открытие генетически детерминированных структур на поверхности клеток, которые регулируют иммунологические реакции.

мосоме. Взаимодействие антигена, Т-рецепторов и молекулы МНС показано на рис. 16.10.

Молекулы МНС класса II также содержат две цепи — α и β. Обе цепи кодируются генами района *D* комплекса *HLA* (у человека) или района *I* комплекса *H-2* (у мыши).

Литература к разделу 16.1

Абелев Г. И. Основы иммунитета // Соросовский образовательный журн. 1996. № 5. С. 4–10.

Галактионов В. Г. Как работает иммунная система // Соросовский образовательный журн. 1997. № 12. С. 2–9.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 433–435.

Попова Н. А. Иммунология. Новосибирск: Изд. НГУ, 1999. 96 с.

Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 327 с.

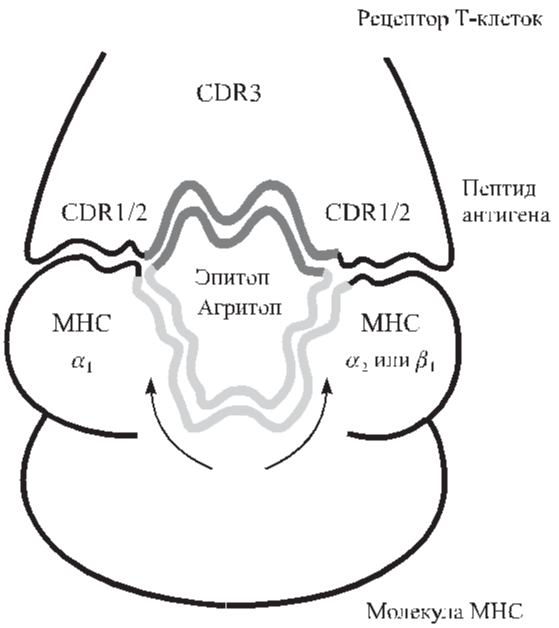
Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2 т. Т. 2. М.: Мир, 1998. С. 283–302.

Щелкунов С. Н. Эпидемия СПИДа // Соросовский образовательный журн. 1999. № 11. С. 22–28.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 1195–1254.

Kuby J. Immunology. 2nd ed. New York: W. H. Freeman, 1994. 660 p.

Рисунок 16.10



Взаимодействие сайтов пептида антигена с рецептором Т-клеток и МНС-молекулой [Kuby, 1994. P. 268]

16.2. НЕКОТОРЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ В РАБОТЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

16.2.1. Синдром приобретенного иммунодефицита — СПИД

Болезнью иммунной системы является СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита). Возбудителем является ретровирус, получивший название вируса иммунодефицита человека — ВИЧ. На вирусной молекуле РНК с помощью обратной транскриптазы синтезируется ДНК, встраивающаяся в геном. В результате транскрипции провирусной ДНК и сборки вирусных частиц клетка-хозяин гибнет. Эта болезнь сопровождается развитием у больных глубокой иммунной недостаточности, проявляющейся в том, что безопасные для здорового человека микроорганизмы приобретают способность вызывать тяжелые инфекционные заболевания. Отличительным свойством ВИЧ является то, что он адсорбируется на поверхности только тех клеток, которые содержат мембранный белок, называемый антигеном CD4. Такой поверхностный антиген в основном содержат T_H-лимфоциты, играющие важнейшую роль в координации работы всей иммунной системы человека. Уничтожение лимфоцитов этого типа и обусловливает иммуносупрессорное действие ВИЧ (см. дополнение 16.5).

16.2.2. Моноклональные антитела

При введении даже одного антигена в организме в ответ возникает большое семейство антител. Связано это с тем, что каждое антитело вырабатывается не на белок или полисахарид, а на их детерминантные группы. В белках детерминантная группа состоит из 6–8 аминокислот, формирующих пространственную структуру данной молекулы. В одной молекуле белка может быть около десятка разных детерминант. В полисахаридах детерминантные группы формируются 3–6 остатками моносахаридов. И даже к одной детерминанте образуется несколько антител, различающихся по свойствам.

Для некоторых целей, в первую очередь экспериментальных, требуются не многокомпонентные смеси антител, а отдельные антитела, направленные лишь к одной детерминанте антигена — моноклональные антитела. Моноклональные антитела получают из гибридом — клеток, образовавшихся в результате слияния антителообразующих клеток (АОК) и опухолевой клетки. У таких гибридных клеток сочетается способность к синтезу антител от нормальных клеток и к неограниченному и бесконтрольному росту — от опухолевых клеток.

Технически гибридомы получают следующим образом: мышей интенсивно иммунизируют определенным антигеном. Когда в их крови появляются антитела, у них берут селезенку и лимфоузлы и готовят взвесь клеток из этих органов. К ней добавляют клетки плазмоцитомы (Пл) — опухоли, в которой избирательно нарабатываются иммуноглобулины и весь синтетический аппарат которой переключен на этот синтез. С помощью полиэтиленгликоля клетки сливают в гибридные. При этом могут образовываться гибриды АОК/АОК, АОК/Пл и Пл/Пл. Из них отбирают только АОК/Пл. После недолгого (несколько дней) культивирования клеток *in vitro* на специфической ГАТ-среде одиночные АОК, а также гибриды АОК/АОК погибают, так как заканчивается срок их жизни. Клетки Пл/Пл и Пл гибнут, так как не способны жить на ГАТ-среде. Выживают только гибриды АОК и плазмоцитомы, так как бессмертие они унаследовали от опухоли, а способность выживать на ГАТ-среде — от нормальной клетки.

16.2.3. Аутоиммунные заболевания

В работе иммунной системы довольно много случаев сбоев, когда она принимает свои антигены за чужие и атакует их. В этих случаях возникают аутоиммунные заболевания. Ими болеет множество людей. Например, только в США 6,5 млн человек поражено ревматоидным артритом — самым распространенным аутоиммунным заболеванием. Юношеский диабет развивается в 11–12 лет и поражает до 0,5 % населения. При этом аутоиммунном заболевании разрушаются островковые клетки поджелудочной железы, продуцирующие инсулин. Для болезни характерно появление аутоантител, которые связываются или с цитоплазматическими, или с мембранными белками островковых клеток.

Рассеянный склероз — это хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, связанное с разрушением миелина — белково-липидной оболочки аксона. В результате возникают различные неврологические нарушения, начиная от неразборчивости речи, кончая параличом. В крупных городах Великобритании около 1 % взрослого населения становятся инвалидами из-за этого заболевания [Фаворова, 1998].

Всего известно более 80 различных аутоиммунных заболеваний.

Литература к разделу 16.2

Абелев Г. И. Моноклональные антитела // Соросовский образовательный журн. 1998. № 1. С. 16–20.

Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 327 с.

Фаворова О. О. Аутоиммунные заболевания как следствие утраты иммунной системой способности отличать свое от чужого // Соросовский образовательный журн. 1998. № 12. С. 19–24.

Щелкунов С. Н. Эпидемия СПИДа // Соросовский образовательный журн. 1999. № 1. С. 22–28.

Дополнение 16.5

Первые случаи СПИДа были зарегистрированы у гомосексуалистов в США в 1981 г. Причины и пути передачи СПИДа сначала были неясны. Однако уже в 1983 г. усилиями двух лабораторий в США и Франции удалось открыть возбудитель СПИДа. Им оказался ретровирус, получивший название «вирус иммунодефицита человека» (ВИЧ).

Источником ВИЧ-инфекции является человек — больной СПИДом или вирусоноситель. ВИЧ обнаружен в крови, сперме, грудном молоке, секрете шейки матки, слюне, слезной жидкости, моче. Однако реально инфекционными являются лишь кровь, сперма, секрет шейки матки и грудное молоко. ВИЧ-инфекция не передается от больного к здоровому при обычном общении. Не выявлено ни одного случая передачи ВИЧ через укусы кровососущих насекомых, таких как комары, вши или постельные клопы. Обычным путем распространения вируса являются половые контакты (вероятность заражения 10–70 %). Другой путь передачи вируса — через зараженную донорскую кровь или ее компоненты (вероятность заражения близка к 100 %), донорские органы и сперму. Чрезвычайно быстро ВИЧ распространяется среди наркоманов, использующих общие иглы для внутривенного введения наркотиков. От инфицированной матери к ребенку ВИЧ передается до или во время родов с вероятностью 25–50 %. Кроме того, ребенок может быть заражен ВИЧ во время кормления грудью.

Точное время и место начала развития ВИЧ/СПИД неизвестны. Однако полагают, что ВИЧ существовал в небольших изолированных поселениях где-нибудь в Центральной Африке, поскольку антитела к ВИЧ были обнаружены в донорской крови, полученной в Заире еще в 1959 г.

К настоящему времени эпидемия СПИДа достигла внушительных размеров: к концу 1996 г. в мире было выявлено более 8,4 млн случаев СПИДа, 74 % этих случаев приходилось на Африку, 8 % — на Северную Америку, 7 % — на Латинскую Америку, 6 % — на Азию, 4 % — Европу и 1 % — на Австралию и Новую Зеландию. При этом число ВИЧ-инфицированных на тот момент превысило 24 млн человек (из них 16 млн приходилось на Африку и лишь 29 тыс. — на Восточную Европу и Центральную Азию) [Щелкунов, 1999].

Глава 17
ОСНОВЫ ОНКОГЕНЕТИКИ

По статистике в мире ежегодно выявляют более 6 млн случаев заболеваний раком шести основных органов (легких, желудка, молочной железы, прямой кишки, шейки матки и простаты). Около половины заболевших погибает. В конечном счете каждый пятый житель развитых стран умирает от онкологических заболеваний (от греч. «онкос» — опухоль). Это само по себе говорит об исключительной важности онкологических исследований даже в чисто прикладных целях. Исследования изменений в функционировании клеток, возникающих при злокачественном перерождении, имеют фундаментальное теоретическое значение.

17.1. ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК И ПРОЦЕСС ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ

Число клеток в каждой ткани, так же как и объем ткани, занимаемый ею в теле, более или менее постоянны. Естественная убыль клеток пополняется из отделов ткани, содержащих низкоспециализированные делящиеся клетки (камбий). Темп восполнения утраченных клеток контролируется экзогенными и эндогенными ростовыми и ингибирующими факторами, выработка которых каким-то образом определяется потребностями данной ткани в пополнении. Если баланс убыль–пополнение по каким-либо причинам нарушается в пользу пополнения, возникает избыточная масса клеток и в месте нарушения баланса образуется гиперплазия (гиперпластическое разрастание) ткани. Она может возникнуть, может длительное время увеличиваться, а может и постепенно исчезнуть. Гиперплазии могут превратиться сначала в доброкачественные, а затем и в злокачественные опухоли. Доброкачественной опухоль называется, если она растет очень медленно и не выходит за пределы своей ткани, т. е. и не внедряется в подлежащие или соседние ткани — не инвазирует, и не метастазирует (рис. 17.1). Мелкие опухоли не содержат кровеносных сосудов, поэтому из-за недостатка снабжения, хотя клетки непрерывно растут и размножаются, этот процесс уравновешивается отмиранием более старых клеток. В итоге опухоль не растет.

Хирургическое удаление доброкачественной опухоли вместе с молодыми клетками, пополняющими ее, как правило, прекращает существование этой опухоли, и она более не возобновляется.

Главным признаком злокачественной опухоли является ее выход за пределы территории, предназначенной для данной ткани. Связано это с тем, что в опухоль начинают врастать сосуды. Получая обильное питание, опухоль растет. Если она врастает в подлежащую ткань, происходит инвазия (внедрение) опухолевых клеток. Инвазия — первый признак злокачественности. Если опухолевые клетки отрываются от основного очага, разносятся лимфой или кровью по организму, оседают в других, отдаленных органах (чаще всего в лимфатических узлах, печени, легких) и образуют там вторичные очаги опухолевого роста, говорят о метастазировании, т. е. распространении опухолевого процесса по всему организму (рис. 17.2).

Рисунок 17.1

Два опухолевых клона среди клеток нормального эпителия [Васильев, 1997б].

Клетки клона, образующего доброкачественную опухоль — полип, дают избыточный прирост и образуют выпячивание над поверхностью слоя клеток, но не проникают в соединительную ткань под эпителием. Клетки злокачественного (ракового) клона проникают (инвазия) под базальную мембрану в соединительную ткань

Рисунок 17.2

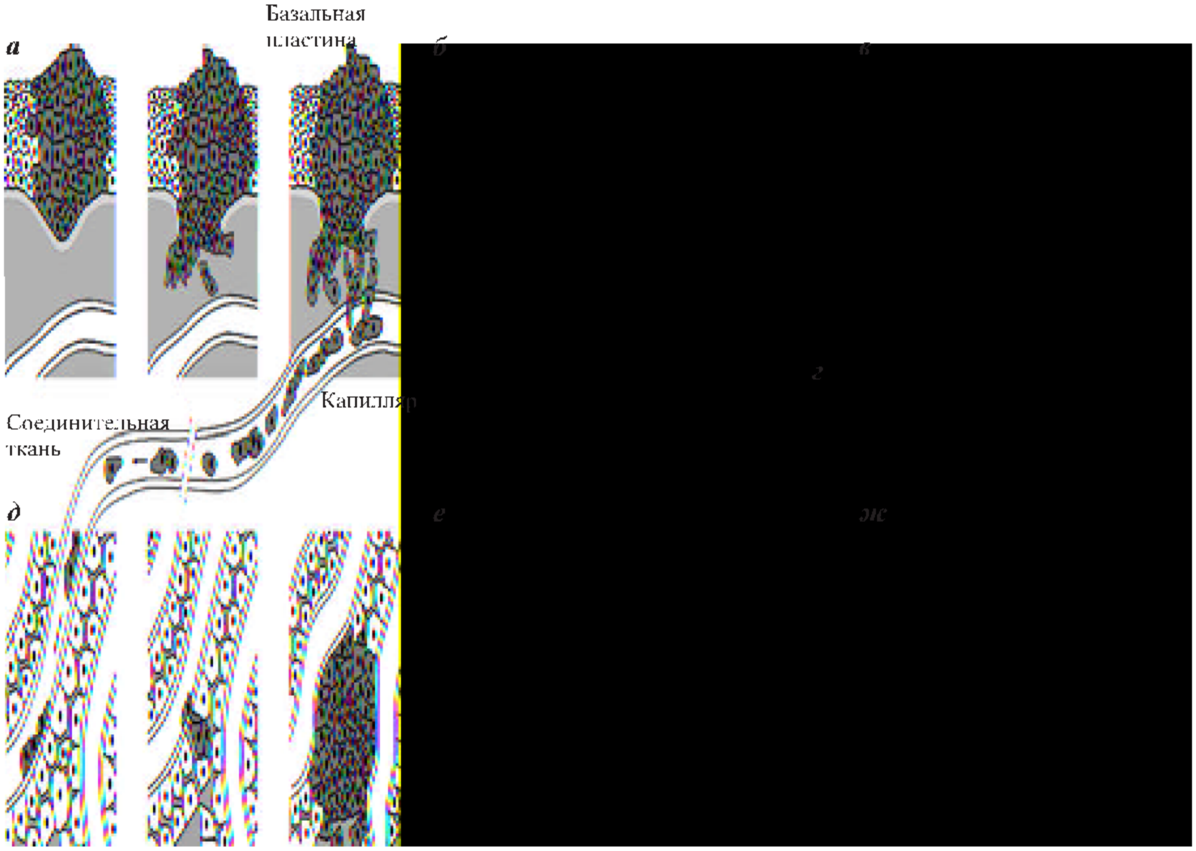


Схема метастазирования опухоли [Alberts et al., 1994. P. 1269]:

а — доброкачественная опухоль в эпителии (например, легких), опухолевые клетки не пересекают базальную пластину (ламину), отделяющую эпителий от соединительной ткани; *б* — разрыв базальной пластинки и инвазия опухолевых клеток в соединительную ткань; *в* — попадание опухолевых клеток в кровеносный капилляр; *г* — миграция клеток по кровеносным сосудам (выживает и образует метастазы менее одной клетки из каждой тысячи опухолевых клеток); *д* — выжившие клетки прилипают к стенке кровеносного сосуда (например, печени); *е*, *ж* — переход опухолевой клетки из сосуда в ткань органа и образование метастаза

Особенно опасны микрометастазы — мельчайшие очажки опухолевого роста, которые зачастую нельзя ни увидеть, ни удалить хирургически. Когда опухоль можно обнаружить, она уже достаточно велика и содержит сотни миллионов клеток: при числе клеток в опухоли 10^8 она становится видимой в ходе рентгеновского обследования, при числе 10^9 она пальпируется. Смерть пациента наступает, когда опухоль состоит примерно из 10^{12} клеток и она нарушает жизненно важные функции органов.

Клетки практически любой опухоли можно пересадить другому генетически сходному (сингенному) животному и получить перевиваемую опухоль, которая будет неограниченно расти — столько, сколько ее будут перевивать. Само существование перевиваемых опухолей говорит о том, что опухоль развивается автономно, что причина ее роста в ней самой, так как перенос в нормальный организм здорового животного не останавливает ее роста.

Автономность опухоли проявляется также в независимости от окружающих тканей. В нормальном развитии соседствующие ткани влияют друг на друга и никогда не выходят за границы своих территорий. Злокачественные опухоли не чувствуют этих влияний. Они инвазируют на чужие территории и способны расти в чуждом окружении. Способность к метастазированию — это способность не столько к отрыву и распространению, сколько именно к росту на чужих территориях и в чуждом микроокружении.

Следующим неотъемлемым свойством злокачественной опухоли является бессмертие ее клеток. Нормальные клетки смертны, их жизненный цикл включает запрограммированную смерть — апоптоз. Будучи высаженными

в культуру, они погибают, пройдя определенное число циклов деления. Клетки опухоли не знают предела для размножения ни в организме, ни вне его.

Очень важным и обязательным признаком злокачественной опухоли является ее моноклональность. Злокачественная опухоль развивается из одной генетически измененной клетки. В этом смысле она представляет собой клон, т. е. потомство генетически однородных клеток, возникших из одной клетки. Одно из доказательств моноклональности получено в результате анализа ДНК. Почти у всех пациентов, страдающих от хронической миелогенной лейкемии, лейкемические белые кровяные клетки отличаются от нормальных клеток специфической хромосомной перестройкой, так называемой филадельфийской хромосомой — транслокацией между длинными плечами хромосом 9 и 22. Когда была клонирована и секвенирована ДНК в районе транслокации, обнаружилось, что участок разрыва и объединения транслоцированных фрагментов идентичен во всех лейкемических клетках каждого больного, но больные между собой несколько различаются в том смысле, что точки разрыва–воссоединения ДНК хромосом могут отстоять на несколько сот или тысяч пар нуклеотидов.

В дальнейшем, в череде генераций в опухоли возникают мутации, которые порождают новые, вторичные клоны, создающие генетическую разнородность внутри опухоли, но это уже вторичная разнородность.

В процессе прогрессии опухоли и селекции клеток у последних постепенно исчезают признаки исходной ткани, так как они зачастую являются мишенью для контроля опухоли со стороны организма или соседних тканей. Однако признаки ткани, из которой развилась опухоль, все же никогда не утрачиваются полностью. Это важная особенность опухоли, позволяющая точно определить, в каком органе и из каких клеток она возникла и к какому лечению вероятнее всего будет чувствительна.

17.2. ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Хорошо известны несколько типов воздействий, с помощью которых можно индуцировать опухоли. Это канцерогенные вещества, опухолеродные вирусы, рентгеновское и ультрафиолетовое облучение. Однако значительная, если не основная часть опухолей возникает спонтанно, т. е. без видимой связи с индуцирующими агентами.

1. Канцерогенные вещества весьма разнообразны — от таких простых, как четыреххлористый углерод (CCl_4), до весьма сложных, таких как метилхолантрен или бензантрацен. Чаще всего они дают сходные биологические эффекты — вызывают мутации, стимулирующие размножение клеток-предшественниц опухоли.

К канцерогенным веществам примыкают вещества, способствующие росту и делению возникших одиночных опухолевых клеток — это так называемые промоторы канцерогенеза. Эти вещества являются чрезвычайно важным компонентом химического канцерогенеза, так как одиночные опухолевые клетки, находясь в окружении нормальной ткани, как правило, не могут преодолеть ее сдерживающего влияния и годами способны сохраняться в латентном состоянии, не проявляясь в виде опухоли. Промоторы снимают это влияние, что внешне выглядит как сильный канцерогенный эффект.

Канцерогенные вещества (включая промоторы) являются причиной многих опухолей человека, например, каменноугольный деготь и содержащийся в нем форболовый эфир (промотор канцерогенеза) вызывает так называемый «рак трубочистов», анилин вызывает у работников красильного производства рак мочевого пузыря, курение — рак легких.

2. Опухолеродные вирусы. Это могут быть ДНК-содержащие вирусы или РНК-содержащие ретровирусы. Все они обладают уникальной способностью к интеграции с геномом клетки-хозяина. Эта удивительная особенность опухолевых вирусов была предсказана российским вирусологом Л. А. Зильбером.

Первый опухолеродный вирус был открыт в 1910 г. П. Раусом у кур. Инъекции бесклеточного фильтрата из саркомы вызывали новые опухоли. Инфицирующим агентом является РНК-содержащий ретровирус (вирус саркомы Рауса), т. е. вирус, на наследственной молекуле РНК которого с помощью обратной транскриптазы синтезируется ДНК, которая встраивается в геном клетки-хозяина.

3. Лучевой канцерогенез. Это одна из форм канцерогенеза, сопровождавшего первых радиологов, работавших с радием и лучами Рентгена без какой-либо защиты от облучения. Обычно это были раки кожи. Наиболее частыми при общем облучении организма являются лейкозы, т. е. различные формы злокачественных новообразований в кроветворной системе.

4. Роль генотипа. В основе возникновения большинства опухолей лежат генетические

причины: реорганизация генома и различные мутации в широком смысле этого слова. В одних случаях это результат отбора. Так, у мышей путем отбора получены чистые линии со 100 %-й вероятностью возникновения определенных форм злокачественных образований — лейкозов, рака молочных желез и рака легких. В первых двух случаях имеет место сочетание генотипа животных и вируса, а в случае наследственного рака легких речь идет о сочетании канцерогенного воздействия и генома животного. Во множестве других случаев причиной возникновения опухолей являются мутации генов, контролирующих нормальное протекание клеточного деления. Под генетическим контролем, по-видимому, находятся стадии опухолевой прогрессии и процесс метастазирования.

17.3. ОНКОГЕНЫ

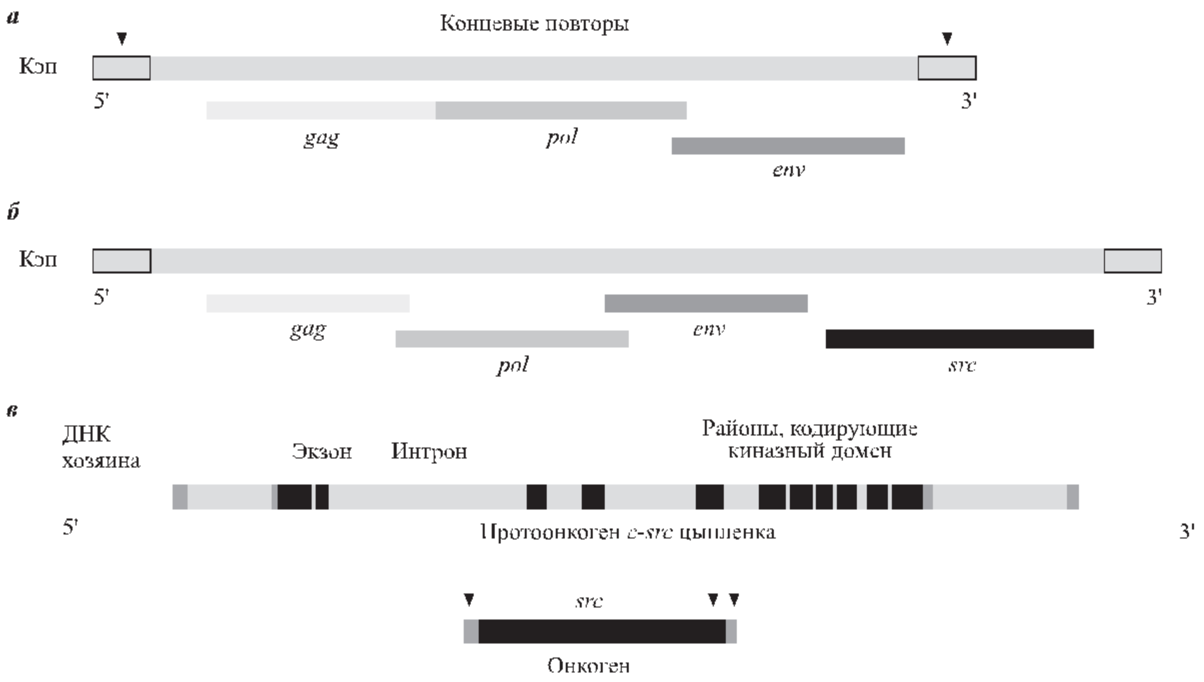
В пользу генетической природы злокачественности свидетельствуют два факта:

1. Корреляции между существованием наследуемых опухолей и наличием специфических хромосомных перестроек в клетках опухоли.

2. Стабильность злокачественных свойств в трансформированных клетках и их передача из одного клеточного поколения в другое.

Наиболее прямые доказательства генетического контроля образования злокачественных опухолей были получены при изучении температурочувствительных мутаций у вирусов. В начале 1970-х гг. были получены температурочувствительные мутанты вируса саркомы, которые трансформировали нормальные клетки в раковые только при определенной, пермиссивной температуре. Это значит, что при этой температуре экспрессируется мутантная форма только одного гена, и этого достаточно для того, чтобы вызвать опухолевую трансформацию и поддерживать ее. Инактивация этой мутации при другой, непермиссивной температуре возвращала клетку в нормальное состояние. Таким образом, сделали вывод, что в вирусе саркомы содержится один ген, вызывающий и поддерживающий злокачественность. Он был назван онкогеном. В 1981 г. был выделен первый онкоген из вируса саркомы курицы — *src* (рис. 17.3).

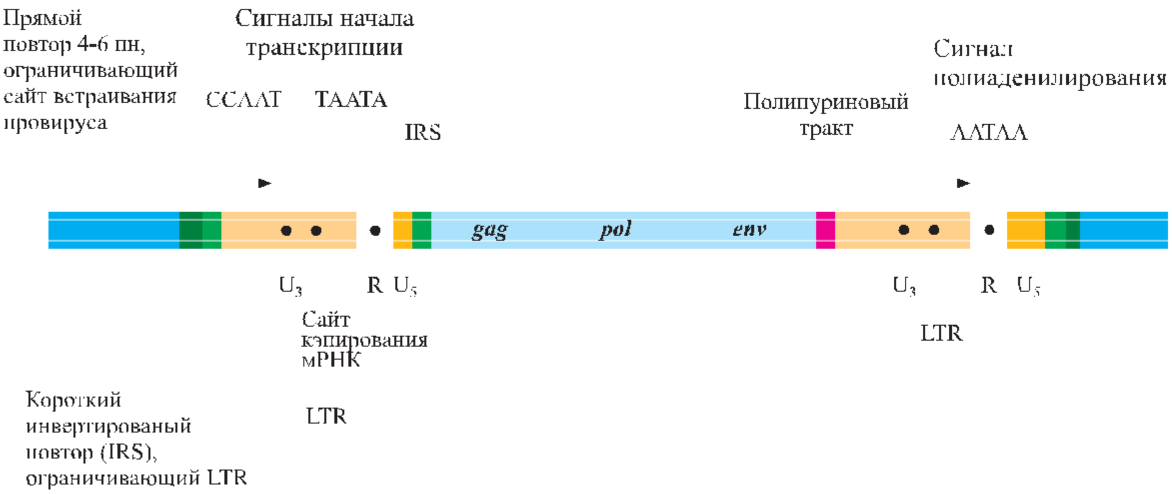
Рисунок 17.3



Структура вирусов лейкемии мыши (*а*) и саркомы Рауса (*б*), а также онкогена *src* и протоонкогена *c-src* (*в*) [Alberts et al., 1994. P. 1276].

gag — ген, кодирующий белок капсиды вируса, *pol* — обратную транскриптазу, *env* — гликопротеиновую оболочку вируса

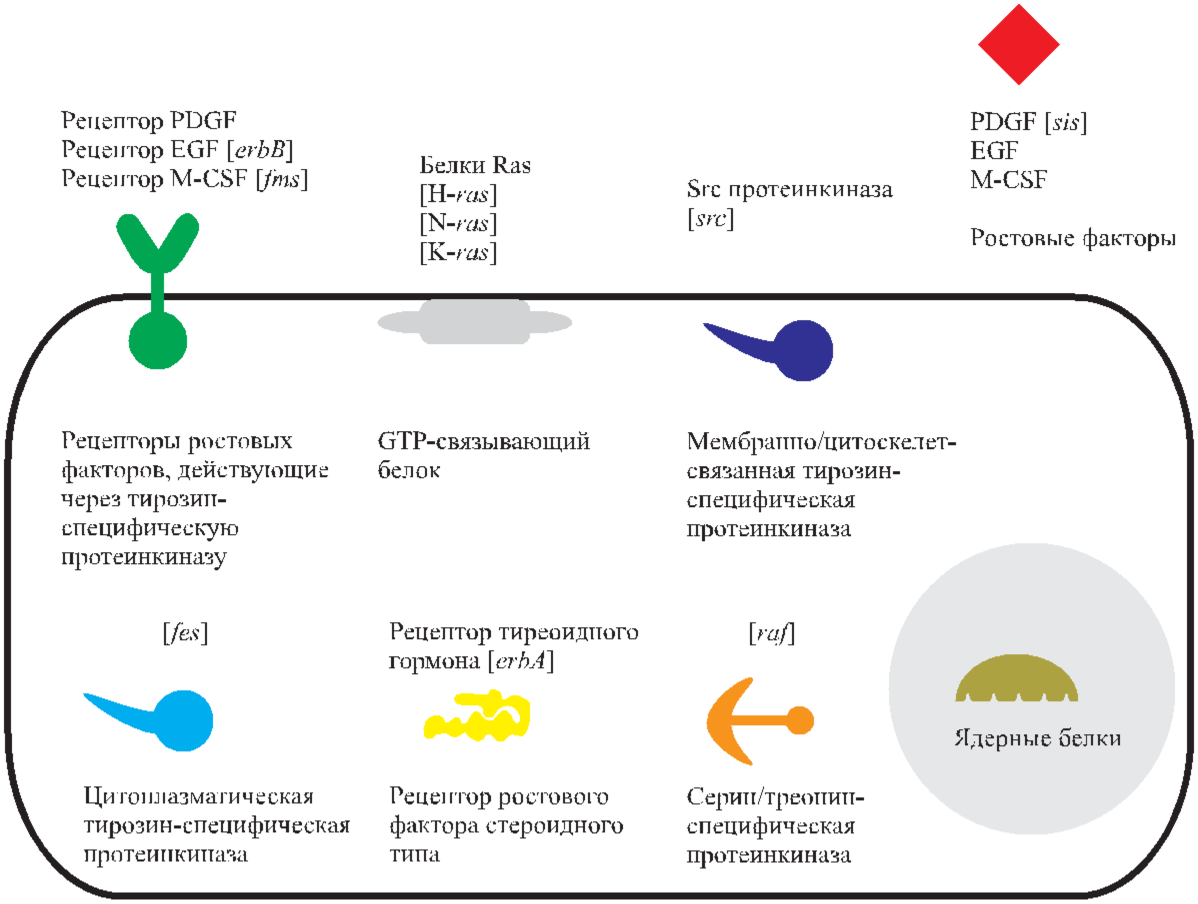
Рисунок 17.4



Особенности организации длинных концевых повторов (LTR) в ДНК у ретровирусов [Russell, 1998. P. 593].

U_3, R и U_5 — элементы вирусных геномов

Рисунок 17.5



Основные этапы передачи сигнала для роста и деления клеток от клеточной оболочки до клеточного ядра [Alberts et al., 1994. P. 1278]

Таблица 17.1. Характеристики некоторых онкогенов и протоонкогенов [Alberts et al., 1994. P. 1276]

Онкоген	Функции протоонкогена	Источник вируса	Опухоль, индуцируемая данным вирусом
abl	Протеинкиназа (тирозин)	Мышь, кошка	Лейкемия, саркома
erb-B	Протеинкиназа (тирозин): рецептор эпидермального фактора роста (EGF). Мутантный рецептор фактора роста непрерывно пересылает сигналы к пролиферации	Курица	Эритролейкемия, фибросаркома
fes	Протеинкиназа (тирозин)	Кошка, курица	Саркома
fms	Протеинкиназа (тирозин): рецептор колониестимулирующего фактора (M-CSF)	Кошка	Саркома
fos, jun	Ассоциирующиеся продукты, образующие ген, регулирующий белок AP1	Мышь, курица	Остеосаркома, фибросаркома
kit	Протеинкиназа (тирозин)	Кошка	Саркома
raf	Протеинкиназа (серин/треонин), активируемая белком RAS	Курица/ мышь	Саркома
myc	Ген, регулирующий белок из семейства HLH. Ядерный фактор, активность которого ведет к непрерывному делению клеток	Курица	Саркома, миелоцитома, карцинома, лейкоз птиц и многие опухоли человека и животных
H-rac, *K-ras*	GTP-связывающий белок, цитоплазматический активированный передатчик сигналов в клетку, ведущий к ее пролиферации	Крыса	Саркома, эритролейкемия
rel	Ген, регулирующий белок, связанный с NFkB	Индейка	Ретикулоэндомиелоз
sis	Ростовой фактор тромбоцитов — PDGF	Мартышка	Саркома
src	Протеинкиназа (тирозин), активированный передатчик сигналов в клетку, ведущий к ее пролиферации	Курица	Саркома птиц и млекопитающих

Вирус саркомы Рауса несколько необычен среди ретровирусов, несущих онкогены, поскольку в нем сохраняются все три гена, необходимые для жизненного цикла вирусов: *gag, pol* и *env*. У других онкогенных вирусов один или два этих гена частично или полностью потеряны в обмен на приобретение трансформирующего онкогена. Поэтому частицы трансформирующего вируса могут формироваться только в клетке, которая одновременно инфицирована нормальным (недефектным) нетрансформирующим вирусом-помощником, который компенсирует отсутствующие функции.

LTR вирусов содержат многие из регуляторных сигналов транскрипции: сайты инициации транскрипции, полиаденилирования и др. (рис. 17.4).

Дополнение 17.1

Пейтон Раус (Peyton Rous) получил Нобелевскую премию 1966 г. за открытие онкогенных вирусов.

Вскоре было показано, что искусственное введение гена *src* в генетический аппарат клетки трансформирует ее и без вируса. После этого были открыты и другие вирусные онкогены: *myc*, *ras*, *abl* и многие другие. Стало ясно, что опухолевые вирусы вызывают опухоли не сами по себе, а потому, что вносят онкоген в генетический аппарат клетки и закрепляют его там. Если удалить онкоген из генетического аппарата вируса, то последний, не лишаясь способности размножаться и интегрироваться в геном клетки, утратит возможность вызывать формирование злокачественных опухолей.

Геномы нормальных клеток позвоночных содержат фрагменты ДНК, которые похожи на ген *src*, входящий в состав вируса саркомы Рауса, но не идентичны ему. Поэтому геномные и вирусные последовательности называют несколько по разному: *v-src* — вирусные (онкогены), *c-src* — клеточные (протоонкогены). Интроны, которые присутствовали в *c-src*, сплайсированы в *v-src* (см. рис. 17.3).

Позднее было найдено свыше 100 вирусных онкогенов и соответствующих им протоонкогенов (табл. 17.1).

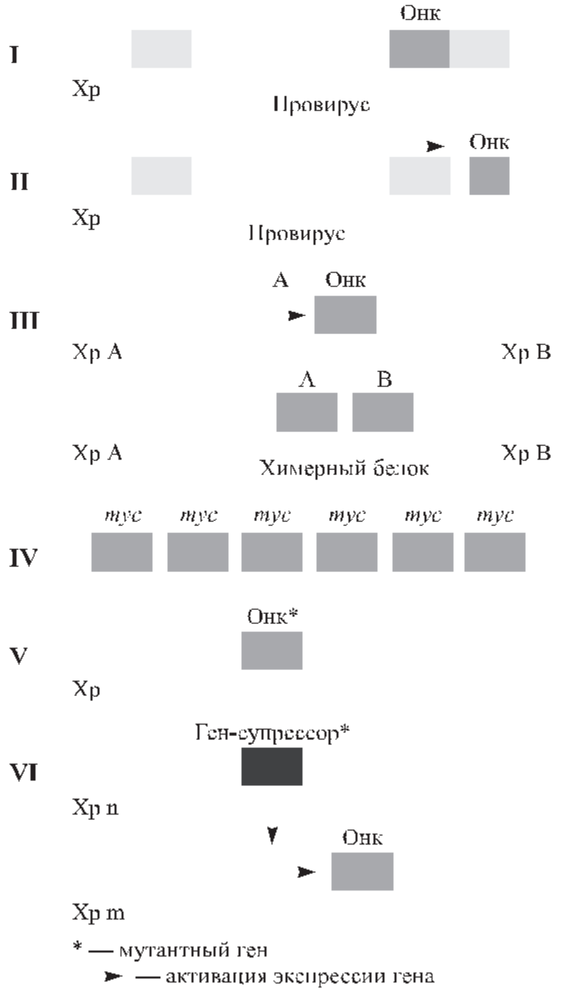
Эти гены регулируют нормальное поведение клетки: ее ответы на ростовые факторы, на гормоны, нормальный темп и «расписание» ее делений. Чтобы клетка начала расти и размножаться, нужны специальные сигналы, вырабатываемые чаще всего другими клетками, а иногда и самой клеткой. Это обычно белковые молекулы, называемые факторами роста (рис. 17.5). Их синтез строго регулируется, но если происходит нарушение регуляции, то факторы могут накапливаться в больших количествах. Они начинают сигнализировать клетке о необходимости расти и делиться. Поэтому гены, кодирующие факторы роста, могут выступать в роли онкогенов. Чтобы фактор подействовал, необходим рецептор на поверхности клетки-мишени. Когда фактор присоединяется к рецептору, последний активируется, что может в ряде случаев выразиться в ферментативной реакции, например фосфорилировании определенных белков. В результате некоторых повреждений рецепторов они обретают способность активироваться даже при отсутствии своего фактора роста и будут непрерывно передавать сигнал о необходимости начинать рост. В случае повреждения ген рецептора становится онкогеном. Передача сигнала для роста клетки не ограничивается факторами роста и их рецепторами. В передаче такого сигнала участвует много других белков, и сам процесс часто идет путем фосфорилирования одним белком второго, вторым — третьего и т. д. Гены, кодирующие участников этих цепей, могут выступать в роли онкогенов.

Цепи передачи сигналов заканчиваются в клеточном ядре. Там происходит активация факторов транскрипции, т. е. белков, связывающихся с регуляторными участками определенных генов и активирующих их транскрипцию. Под действием факторов транскрипции на соответствующих генах происходит синтез матричных РНК, а на матрице последних — белков. Это те белки, которые нужны для роста и размножения клеток. И среди генов, кодирующих факторы транскрипции, оказываются онкогены (см. рис. 17.5). Таким образом, многие гены, кодирующие белки передачи сигнала для роста и размножения клеток, являются потенциальными онкогенами, и при повреждении или нерегулируемой активации этих генов клетки превращаются в раковые.

Можно заключить, что у вирусов в цикле их развития происходит захват генов хозяина (например, мыши или человека) и последние выступают в роли онкогенов.

Известны различные пути активирования протоонкогенов, в результате чего они становятся автономными (рис. 17.6). Как правило,

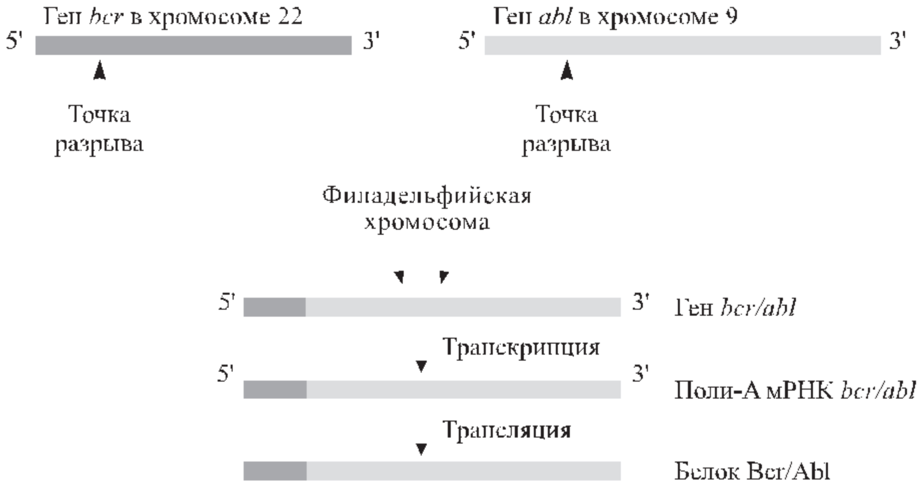
Рисунок 17.6



Происхождение и активация онкогенов [Абелев, 1997].

I — вирусный онкоген: часть вирусного генома, интегрированного в хромосому хозяина (провирус). Онк — онкогены ретровирусов, например, *src*, *myc*, *ras*, *erb*; Хр — хромосома хозяина. II — активация клеточного онкогена встроенным провирусом (например, онкоген *Int-1* при раке молочных желез мышей). III — хромосомные транслокации — разрыв и воссоединение фрагментов разных хромосом в единую новую хромосому могут привести к активации онкогена или образованию нового. В первом случае молчащий ген попадает под контроль работающего промотора или энхансера клеточного гена и активируется (например, ген *myc* при лимфоме Бэркитта). Во втором случае в месте разрыва–воссоединения образуется новый химерный ген, кодирующий химерный белок (например, белок химерного гена *bcr–abl* при хроническом миелолейкозе). IV — амплификация (увеличение числа копий) протоонкогена, ведущая к опухолевой трансформации (амплификация гена *myc* при опухолях нервной системы). V — мутация протоонкогена — синтез мутантного онкобелка (например, *c-ras* при спонтанных и канцерогенных опухолях). VI — инактивация или утрата гена-супрессора опухолевого роста, ведущая к активации протоонкогена (например, ген *RB* в клетках ретинобластомы человека; ген *p53* в клетках разных опухолей человека)

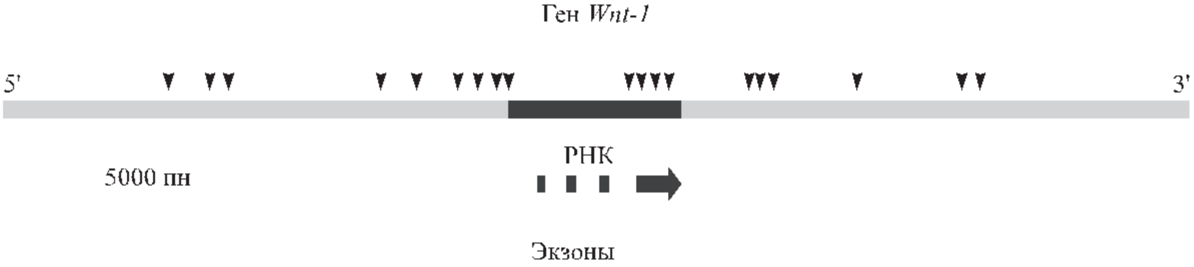
Рисунок 17.7



Превращение протоонкогена *abl* в онкоген у пациентов с хронической миелогенной лейкемией [Alberts et al., 1994. P. 1278].

В результате транслокации хромосом 22 и 9 (филадельфийская хромосома) ген *bcr* соединяется с геном *abl* тирозиновой протеинкиназы, в результате чего этот ген функционирует не по своему расписанию

Рисунок 17.8



Локализация инсерций (показаны стрелками) вируса рака молочных желез мыши, активирующих транскрипцию гена *Wnt-1* [Alberts et al., 1994. P. 1277].

Инсерция влияет на экспрессию гена, даже если она находится на расстоянии до 10 тпн

действие различных канцерогенных факторов приводит к постоянной активности протоонкогена. Так, хромосомные транслокации могут перенести протоонкоген в новое положение — под контроль постоянно активного промотора (рис. 17.7). В результате этого переноса протоонкоген начинает работать непрерывно, не давая клетке выйти из цикла делений (*myc*), или посылая непрерывные сигналы с мембраны в ядро (*ras*), или приводя к синтезу ростовых факторов.

Некоторые опухолевые вирусы сами по себе не содержат онкогена, но, встраиваясь в хромосому рядом с протоонкогеном, активируют его, вызывая непрерывную экспрессию, — это «вставочный» канцерогенез (рис. 17.8).

Канцерогенные вещества и облучение обладают высокой мутагенной активностью, вызывая мутации в различных генах, в том числе и в протоонкогенах. Эти мутации могут вести либо к нарушению регуляции протоонкогена, и тогда он выходит из-под контроля, либо к изменению свойств белка, кодируемого этим онкогеном.

Дополнение 17.2

Нобелевская премия 1975 г. присуждена Дэвиду Балтимору (D. Baltimore), Ренато Дульбекко (R. Dulbecco) и Ховарду Темину (H. Temin) за установление связи между опухолеродными вирусами и генетическим материалом клетки.

Дж. М. Бишоп (J. M. Bishop) и X. E. Вармус (H. E. Varmus) в 1989 г. получили Нобелевскую премию по медицине за открытие клеточной природы ретровирусных онкогенов.

17.4. АНТИОНКОГЕНЫ, ИЛИ ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ ОПУХОЛЕЙ

Вскоре после открытия первых онкогенов появились сообщения о существовании генов, утрата или подавление активности которых также приводит к развитию опухолей. Иными словами, белковые продукты этих генов необходимы для того, чтобы не дать клетке превратиться в раковую. Эти гены были названы антионкогенами или генами-супрессорами опухолей (ГСО). Число известных ГСО тоже быстро растет, хотя и уступает числу открытых онкогенов.

Примерно один из каждых 20 тыс. детей имеет предрасположенность к ретинобластоме — опухоли, возникающей в детстве из предшественников клеток сетчатки глаза. Известны две формы заболевания: наследственная и ненаследственная. В первом случае множественные опухоли обычно возникают независимо в обоих глазах. При ненаследственной форме возникает только одна опухоль и только в одном глазу.

На рис. 17.9 показаны схемы наследования мутантного гена, индуцирующего ретинобластому. Предположили, что у особей с наследственной формой утрачена активность гена-супрессора опухолеобразования в одной из хромосом. Поэтому гетерозиготы по мутации данного гена являются генетически предрасположенными к раку. Первая же соматическая мутация этого локуса делает данную клетку гомозиготой по мутации, и начинает развиваться опухоль. Таким образом, ретинобластома возникает по двухударному механизму: одна мутация происходит в генеративных клетках, другая — в соматических. Этот ген, отсутствие активности которого у человека является критическим фактором в развитии ретинобластомы, называется *Rb*. У детей-гомозигот по нормальному аллелю гена *Rb* опухоль возникает очень редко, только вследствие случайного мутирования этого гена в обеих хромосомах одной клетки.

В более поздних исследованиях было установлено, что потеря активности гена *Rb* вызывает разнообразные формы опухолей, не только ретинобластому.

Ген *Rb* был клонирован в 1986 г., он занимает в геноме 180 тпн и кодирует белок с молекулярной массой 110 кДа. Ген активно функционирует в большинстве нормальных клеток тела, и его продукт действует как один из главных «тормозов» в клеточных делениях. Функционирование гена *Rb* непосредственно связано с контролем продвижения клетки в митотическом цикле.

Рисунок 17.9

Схема мутирования гена *Rb* и образования наследственной и ненаследственной форм ретинобластомы у человека [Alberts et al., 1994. P. 1282]

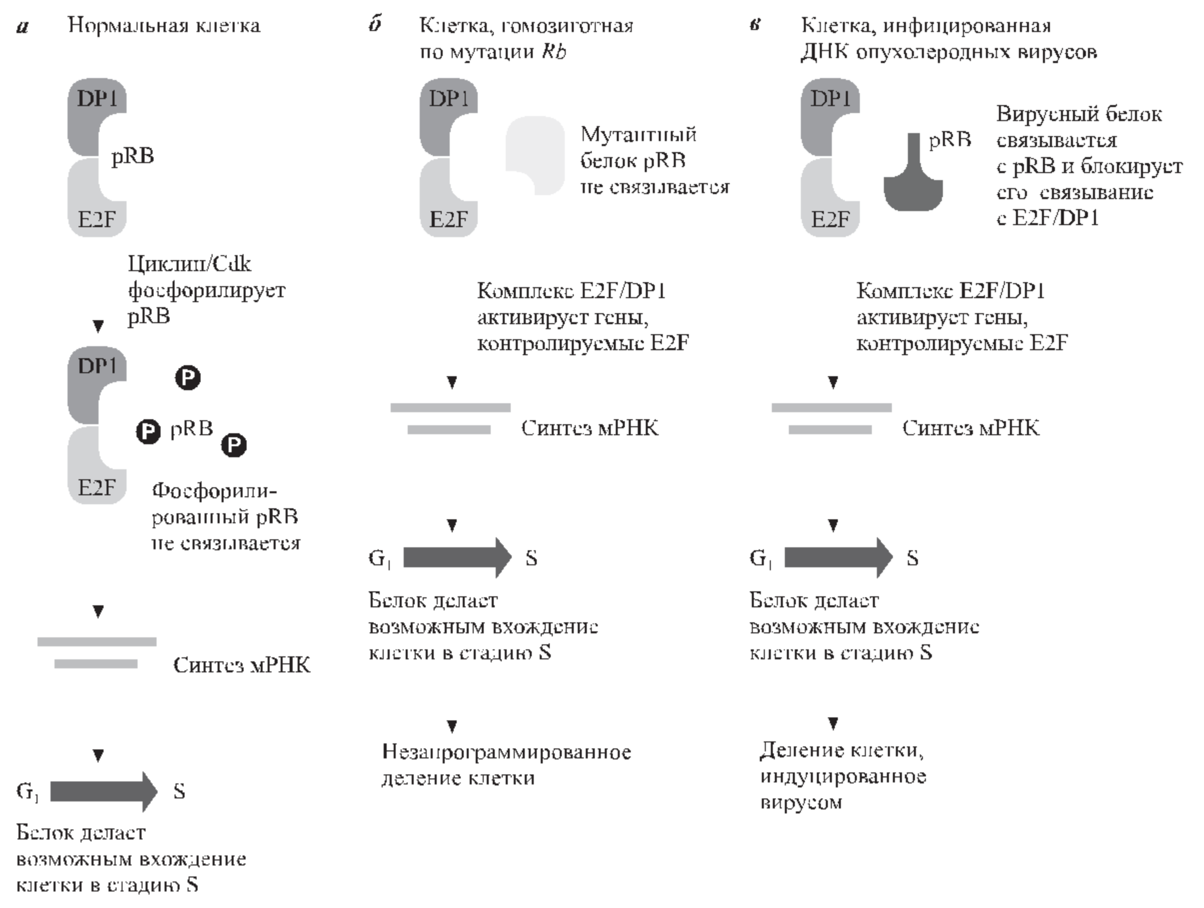
Как уже говорилось, размножаясь, клетки проходят несколько фаз клеточного цикла. Важнейшие фазы — это деление клеток, или митоз (M); фаза, предшествующая синтезу ДНК (G_1); фаза репликации ДНК (S); следующая за ней фаза подготовки к делению (G_2) и снова митоз (M). Кроме того, клетки могут переходить из G_1 не в S, а в фазу G_0 (см. разд. 6.3.2). Переход из одной фазы клеточного цикла в другую — это строго регулируемый процесс. На определенных этапах клеточного цикла существуют так называемые «точки проверки» (checkpoints), в которых специальные белки определяют, все ли в клетке в порядке и готова ли она к переходу в следующую фазу цикла. Например, если в клетке повреждена ДНК, сигнал об этом блокирует переход в следующую фазу. Такая система проверок требует большого числа специальных белков. Ключевая роль в разрешении на продвижение по циклу принадлежит белкам из семейства циклинов. Они связываются со специальными ферментами, фосфорилирующими белки, — циклин-зависимыми киназами (ЦЗК, или Cdk). Только находясь в комплексе с циклинами, ЦЗК начинают фосфорилировать свои белки-мишени, а это в свою очередь активирует гены, продукты которых нужны на следующей фазе цикла.

В каждом клеточном цикле образуется комплекс факторов транскрипции DP1/E2F с продуктом гена *Rb* (pRB), находящимся в нефосфорилированном состоянии (рис. 17.10, *а*). Данный комплекс не участвует в процессе подготовки к репликации ДНК, и клетка не переходит от стадии G_1 к S. До тех пор пока этот статус сохраняется, клетки пребывают в стадии G_1.

В случае, если белок pRb фосфорилируется под воздействием комплекса циклин/циклин-зависимая киназа, он больше не связывается с факторами транскрипции DP1/E2F. Освобожденная молекула DP1/E2F взаимодействует с регуляторными участками генов, чья активность требуется для перехода в S-фазу, и включает их.

Если оба гомологичных гена в клетке находятся в мутантном состоянии, белок pRb нефункционален. Он не связывается с комплек-

Рисунок 17.10



Роль белка pRb в переходе клеток от стадии клеточного цикла G_1 к стадии S [Russell, 1998. P. 606]

сом DP1/E2F, который постоянно активирует гены, ответственные за переход в S-фазу. В результате деление клеток идет значительно чаще, чем это запланировано (рис. 17.10, *б*).

Некоторые онкогенные вирусы (например, аденовирусы, вирус SV40) осуществляют опухолеродное действие тем, что их онкогены кодируют белки, образующие комплексы с белком pRb, а это также предотвращает его связывание с комплексом факторов транскрипции DP1/E2F (*в*).

Другой ген-супрессор опухолеобразования называется *p53* (p — protein, 53 — молекулярная масса в кДа). С мутантными аллелями этого гена, а их к настоящему времени выделено свыше 3400, связывают развитие примерно 50 % всех типов опухолей у человека. Действие гена *p53* определяется его участием в контроле событий запрограммированной гибели клеток — апоптоза.

Что происходит с клеткой, которая остановилась в своем продвижении по клеточному циклу в точке проверки, например, из-за того, что в ней оказалась повреждена ДНК? Первый путь — это устранение поврежденной ДНК с помощью специальных ферментов системы репарации. Если репарация не происходит, то клетка вступает на путь апоптоза (см. разд. 15.8). Приходят в действие специальные клеточные системы, которые разрушают ее жизненно важные структуры, и клетка умирает. С помощью именно этих механизмов устраняются многие клетки, приобретшие черты раковых.

Как уже отмечалось, белковый комплекс cyc/Cdk способен стимулировать переход клетки из G_1 в S-фазу.

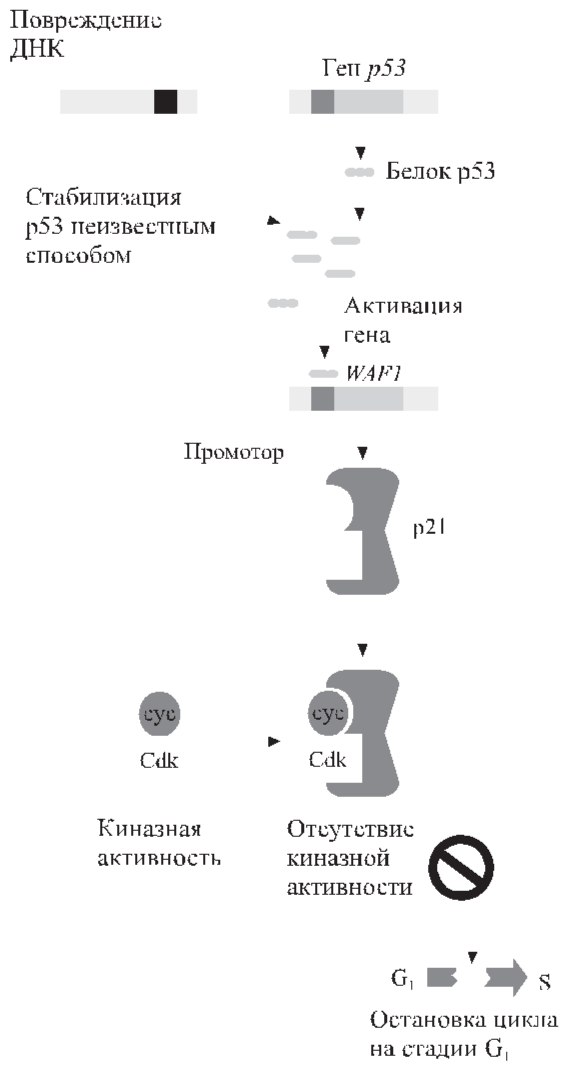
Белок — продукт гена *p53* способен связываться с ДНК регуляторных районов различных генов и действует как фактор транскрипции (рис. 17.11). Одним из генов, воспринимающих сигнал от *p53*, является *WAF1*. Если синтезируется продукт гена *WAF1* — белок p21, он связывается с комплексом cyc/Cdk, что блокирует киназную активность, необходимую для перехода из G_1 в S-фазу. Однако белок p53 в нормальной клетке нестабилен, в результате чего белок p21 синтезируется в небольших количествах.

В нормальной клетке самым простым способом вызвать каскад генной активности, ведущий к остановке в G_1, является индукция повреждений в молекуле ДНК, например, облучением клетки. В результате этого по непонятным причинам повреждения ДНК приводят к стабилизации белка p53 и начинается каскад событий, изображенный на рис. 17.11.

Задержка в G_1 дает клетке время индуцировать систему репарации ДНК. Если повреждения ДНК слишком велики и не могут быть восстановлены, клеточный цикл далее не продолжается, а клетка переходит на режим апоптоза. Индукция апоптоза является важнейшей функцией гена *p53*.

У клеток-гомозигот по мутации гена *p53* не активируется ген *WAF1* и нет белка p21, чтобы блокировать активность cyc/Cdk, в результате клетка не задерживается в фазе G_1 и апоптоз не происходит. Клетка ускоренно вступает в S-фазу, да к тому же и отягощенная повреждениями ДНК. Все это увеличивает вероятность возникновения рака.

Рисунок 17.11



Каскад событий, в результате которых нарушения структуры ДНК обусловливают остановку клеточного цикла в фазе G_1 [Russell, 1998. P. 607].

По неизвестным причинам повреждения ДНК стабилизируют белок p53, который активирует ген *WAF1*, кодирующий белок p21. Последний блокирует киназную активность, необходимую для перехода клетки из G_1 в S-фазу

17.5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Одной из главных проблем сегодняшней онкологии является разгадка природы метастазирования: что позволяет клетке поселяться и давать вторичные очаги опухоли на чужой территории, каким образом у опухолевой клетки возникает способность взаимодействовать с чужеродным матриксом, т. е. внеклеточным веществом, выделяемым клетками соединительной ткани? В 1984 г. был клонирован ген *mts-1*. В результате сравнения двух линий опухолевых клеток у мышей CSML-100 и CSML-0 оказалось, что во второй линии не формировались метастазы. В линии CSML-100 была обнаружена мРНК размером 0,55 тпн, которая отсутствовала в линии CSML-0. Эта мРНК была обнаружена во многих опухолях, способных образовывать метастазы. Доказательства участия гена *mts-1* получены в опытах на трансгенных животных. Если ввести в ядро яйцеклетки мыши конструкцию, содержащую высокоэкспрессирующийся ген *mts-1*, и затем этих трансгенных мышей скрестить с мышами из линии с высокой способностью к формированию рака молочной железы, у значительной доли потомства развиваются опухоли как молочной железы, так и легких, возникшие вследствие метастазов [см. подробнее: Georgiev et al., 1997; Георгиев, 2000].

17.6. МНОГОСТУПЕНЧАТОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ ОПУХОЛИ (ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ)

Шанс заболеть раком чаще всего резко увеличивается с возрастом: например, если в возрасте 40 лет выявляемость первого заболевания раком составляет 8 случаев на 100 000 человек (данные для женщин Англии и Уэльса), в 60 лет — уже около 60, а в 70 — 120. Связано это с тем, что формирование многих опухолей является многоступенчатым процессом, включающим аккумуляцию мутаций по ряду генов.

Во-первых, прорастание кровеносных сосудов в опухоль находится под контролем ряда генов. Далее, чтобы клетки опухоли приобрели способность отделяться от исходной опухолевой массы и формировать метастазы, должны произойти мутации кадхерин-катениновых генов. Продукты этих генов жестко связывают между собой все клетки эпителия в единую систему. Статистика возникновения опухолей у человека показывает, что необходимо накопление в клетке 6–7 мутаций в течение последних десятилетий жизни для того, чтобы рак развился. Например, формирование злокачественной опухоли толстой кишки проходит ряд стадий. Сначала утрачивается ген-супрессор *APC* (adenomatous polyposis coli) и возникает небольшая опухоль. В сочетании с гипометилированием ДНК может развиться аденома I класса (небольшой полип из эпителия толстого кишечника или прямой кишки). Далее, если вследствие мутации протоонкоген *K-ras* превращается в онкоген, размер опухоли увеличивается (аденома класса II). Если затем происходит гомозиготизация мутации опухолевого супрессора *DCC,* опухоль снова увеличивается в размерах (аденома III класса).

Утрата обеих копий гена *p53* превращает доброкачественную аденому в злокачественную карциному. Потеря каких-то других генов вызывает метастазы этой опухоли.

Литература

Абелев Г. И. Что такое опухоль // Соросовский образовательный журн. 1997. № 10. С. 85–90.

Васильев Ю. М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. I. Сигнальные молекулы, вызывающие размножение и гибель клеток // Соросовский образовательный журн. 1997а. № 4. С. 7–22.

Васильев Ю. М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. II. Клетки строят ткань // Соросовский образовательный журн. 1997б. № 5. С. 20–25.

Зильбер Л. А. Вирусо-генетическая теория возникновения опухолей. М.: Наука, 1968. 273 с.

Георгиев Г. П. Молекулярно-генетические подходы к терапии рака // Вестн. РАН. 1998. Т. 68, № 5. С. 400–404.

Георгиев Г. П. Как нормальная клетка превращается в раковую // Соросовский образовательный журн. 1999. № 4. С. 17–22.

Георгиев Г. П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 11. С. 2–7.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York; London: Garland Publishing Inc., 1994. P. 1255–1294.

Georgiev G. P., Kiselev S. L., Lukanidin E. M. Tumor progression and metastasis // Genome structure and function / C. Nicolini (ed.). Dordrecht et al.: Kluver Acad. Publ., 1997. P. 217–237.

Grigorian M. S., Tulchinsky E. M., Zain S. et al. The *mts1* gene and control of tumor metastasis // Gene. 1993. Vol. 135. P. 229–238.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. p53 mutations in human cancers // Science. 1991. Vol. 253. P. 49–53.

Hunter T. Oncoprotein network // Cell. 1997. Vol. 88. P. 333–346.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 585–614.

Levine A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division // Cell. 1997. Vol. 88. P. 323–331.

Marshall C. J. Tumor suppressor genes // Cell. 1991. Vol. 64. P. 313–326.

Глава 18
ГЕНЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ

18.1. ПОПУЛЯЦИИ И ГЕНОФОНД

Любой вид живых существ распространен по занимаемому им ареалу не сплошь, а в той или иной мере обособленными друг от друга совокупностями особей — популяциями. Условия жизни в разных местах ареала неоднородны, и особи данного вида концентрируются преимущественно в наиболее благоприятных для них участках ареала. Однако не всякая изолированная группа особей представляет популяцию, так как в пределах группы особи часто тоже распространены неравномерно, образуя относительно немногочисленные группировки, сохраняющиеся лишь в течение короткого времени (одного-двух поколений).

Для дальнейшего понимания важно иметь представление о панмиктической и подразделенной популяциях. В панмиктической популяции слагающие ее особи свободно скрещиваются друг с другом. Подразделенная популяция представлена совокупностью субпопуляций, испытывающих одновременное воздействие случайного дрейфа, миграции генов и естественного отбора.

Наиболее четкое определение реально существующей популяции дали Н. В. Тимофеев-Ресовский, А. В. Яблоков и Н. В. Глотов в 1973 г. для видов, размножающихся половым путем при перекрестном оплодотворении: популяция — это совокупность особей данного вида, в течение длительного времени (большого числа поколений) населяющих определенный ареал и имеющих возможность скрещиваться друг с другом, которая отделена от таких же соседних совокупностей одной из форм изоляции (пространственной, сезонной, физиологической или генетической).

Реальные популяции ограничены по численности, кроме того, генетически эффективная численность (*Ne*) популяции всегда существенно меньше ее общей численности (*Nt*) уже по той простой причине, что старшие и младшие возрастные группы исключены из процесса воспроизводства. У человека, например, если обратиться к сельскому населению, величина *Ne* составляет примерно треть от величины *Nt*. У других видов отношение *Ne*/*Nt* может быть еще меньше, порядка 0,1–0,2.

При изучении процесса эволюции популяций важное значение имеет представление о генофонде. Генофондом (gene pool) называют совокупность генотипов всех особей популяции. Для диплоидных организмов генофонд популяции, насчитывающей N особей, состоит из $2N$ гаплоидных геномов. Таким образом, генофонд популяции из N особей включает в себя по $2N$ генов каждого локуса и N пар гомологичных хромосом. Исключение составляют половые хромосомы и сцепленные с полом гены, представленные в каждом гетерогаметном организме в одном экземпляре.

18.2. ЗАКОН ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА

При переходе от индивидуальных скрещиваний, связанных с анализом наследования в семьях, к генетике популяций, где единой теорией необходимо охватить последствия от множества свободных скрещиваний, встает ряд новых проблем, в частности, каким образом в популяциях сохраняются как доминантные, так и рецессивные гены? Почему доминантные аллели не вытесняют рецессивные? На этот вопрос в 1908 г. попытались ответить английский математик Дж. Харди (G. Hardy) и немецкий врач Г. Вайнберг (G. Weinberg).

Работая независимо, Харди и Вайнберг показали, что генетические расщепления, которые происходят в каждом поколении у диплоидных организмов, сами по себе не изменяют общего состава генофонда. Чтобы продемонстрировать это, они исследовали поведение аллелей в идеализированной популяции, в которой соблюдаются следующие пять условий:

1) новые мутации в данной популяции не появляются;

2) популяция полностью изолирована, т. е. нет миграции особей — носителей генов

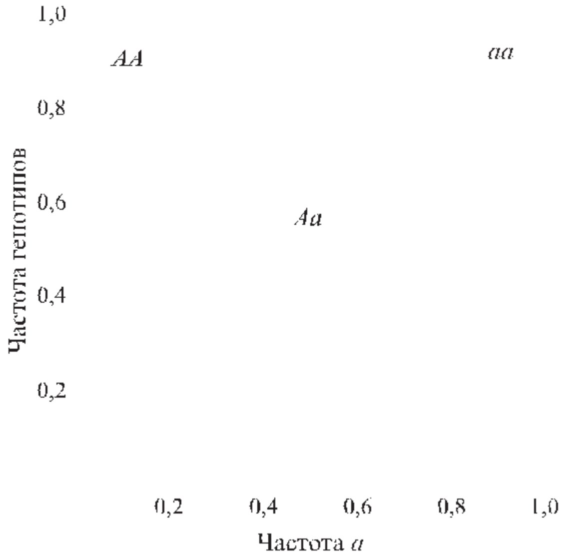
Рисунок 18.1

Частота аллелей	$A = 0{,}8$	$a = 0{,}2$
$A = 0{,}8$	*AA* 0,64	*Aa* 0,16
$a = 0{,}2$	*Aa* 0,16	*aa* 0,04

Результаты случайного скрещивания в популяции.

Принимается, что ген не сцеплен с полом и что аллели встречаются у самок и самцов с одинаковой частотой

Рисунок 18.2



Взаимосвязи между частотой аллеля *a* в популяции и частотами генотипов *AA*, *Aa* и *aa*.

Чем чаще встречаются генотипы *AA*, тем ниже частота *a*. Поскольку частоты *AA*, *Aa* и *aa* взаимосвязаны, изменение частоты любого аллеля приводит к соответствующим и симметричным изменениям в частотах другого аллеля и всех генотипов

в популяцию (иммиграция) и из популяции (эмиграция);

3) популяция бесконечно велика, к ней можно применять законы вероятности, т. е. когда в высшей степени маловероятно, что одно случайное событие может изменить частоты аллелей;

4) скрещивания случайны, т. е. происходит чисто случайное образование родительских пар — панмиксия;

5) все аллели равно влияют на жизнеспособность гамет, другими словами, нет различий в репродуктивном успехе, и потомки от всех возможных скрещиваний имеют равновероятную выживаемость.

Рассмотрев одиночный ген, имеющий только два аллеля, *A* и *a*, Харди и Вайнберг с помощью математического уравнения показали, что пропорции аллелей *A* и *a* в такой идеальной популяции не изменяются от поколения к поколению. Более того, остаются постоянными частоты трех возможных комбинаций этих аллелей — генотипы *AA*, *Aa* и *aa*. Частоты генов находятся в состоянии равновесия по этим аллелям. Это равновесие выражается уравнением:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

где p — частота одного аллеля, q — другого. $p + q$ всегда составляет единицу, p^2 и q^2 — частоты особей, гомозиготных по соответствующему аллелю, $2pq$ — частота гетерозигот. Как видно, соотношение гомо- и гетерозиготных генотипов соответствует коэффициентам разложения бинома Ньютона.

Чтобы понять, как Харди и Вайнберг вывели свое уравнение и продемонстрировали равновесие частот аллелей и генотипов в популяциях при выполнении пяти вышеупомянутых условий, рассмотрим более подробно ситуацию с единственным геном, имеющим только два аллеля, *A* и *a*. Важно проследить, как пропорции аллелей *A* и *a* передаются от одного поколения к другому.

Предположим, что в какой-то популяции доля аллеля *A* составляет 80 %, т. е. частота *A* — 0,8, или $p = 0{,}8$. Поскольку аллелей только два, частота аллеля *a* будет 0,2 ($q = 1 - p$). Представим, что частоты *A* и *a* одинаковы как у самцов, так и у самок, при этом самцы и самки скрещиваются совершенно случайно. Составив решетку Пэннета, получим частоты результирующих генотипов (рис. 18.1): 64 % — *AA*, 32 % — *Aa* и 4 % — *aa*.

Можно подсчитать частоты и по формуле Харди–Вайнберга:

$p^2 = 0{,}8 \times 0{,}8 = 0{,}64$ (частота генотипов *AA*),
$2pq = 2 \times 0{,}8 \times 0{,}2 = 0{,}32$ (частота *Aa*),
$q^2 = 0{,}2 \times 0{,}2 = 0{,}04$ (частота генотипов *aa*).

Что же случилось с частотами двух аллелей в генофонде в результате этого скрещивания? Частота *AA* составляет 0,64 плюс половина от 0,32 (генотипы *Aa*), получается $0{,}64 + 0{,}16 = 0{,}8$, т. е. частота аллеля *A* не изменилась. Считая аналогичным образом, получаем частоту аллеля $a = 0{,}04 + 0{,}16 = 0{,}2$. Отсюда вытекает, что частота аллеля *a* также не изменилась. Таким образом, в идеализированной популяции, в которой выполняются указанные 5 условий, ни частота аллелей, ни час-

тота генотипов не изменяется от поколения к поколению.

Различные диплоидные комбинации множественных аллелей могут давать различные переходные фенотипы. Уравнение Харди–Вайнберга применимо и к этим ситуациям, хотя оно становится более сложным. Например, частоты генотипов для трех аллелей описываются выражением

$$(p + q + r)^2 = 1,$$

где r — частота третьего аллеля.

Уравнение позволяет количественно оценивать изменения, происходящие в популяциях, и определять их направление. Если удастся найти в популяции гомозиготных особей, можно подсчитать частоту этого аллеля, а затем и частоты остальных генотипов. Если провести эту работу в нескольких поколениях, можно увидеть, какие процессы идут в генофондах популяций, и затем искать причину.

Как уже указывалось, правило Харди–Вайнберга применимо только в том случае, если выполняются все пять условий, характеризующих идеальную популяцию. Если нарушается хотя бы одно из них, частоты аллелей начнут изменяться. Представим, что в паре аллелей *A* и *a* один из них (*a*) у гомозигот вызывает повреждения, несколько уменьшающие вероятность выживания или оставления потомства. Можно подсчитать число особей — носителей генотипов *aa* в этой популяции, допустим, 1 на 10 000, другими словами, $q^2 = 0{,}0001$. Таким образом, $q = \sqrt{0{,}0001} = 0{,}01$. Если $q = 0{,}01$, то $p = 0{,}99$, а $2pq = 0{,}0198$, или почти 0,02. Таким образом, 2 % популяции — одна особь на 50 — могут быть гетерозиготными носителями аллеля *a*. Если провести этот же анализ через 5 лет и найти частоту $q = 0{,}009$, а еще через 5 лет — 0,008, можно сделать вывод о том, что в популяции медленно осуществляются эволюционные изменения. Частота одного аллеля уменьшается, другого — увеличивается (рис. 18.2).

18.3. ФАКТОРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ В ПОПУЛЯЦИЯХ

Довольно скоро стало ясно, что правило Харди–Вайнберга неприменимо к реально существующим популяциям, на которые оказывают давление многочисленные факторы.

В работе С. С. Четверикова, которая была опубликована в 1926 г., впервые были показаны закономерности возникновения мутаций и их распространения внутри популяций как в условиях свободного скрещивания, так и при искусственной изоляции, а также при наличии плейотропии.

Прямая взаимосвязь между степенью генетической изменчивости популяции и скоростью эволюции под действием естественного отбора была доказана математическим путем Р. Фишером в работе, опубликованной в 1930 г., где он ввел понятие приспособленности и сформулировал фундаментальную теорему естественного отбора.

Другими исследователями, заложившими в 1931–1932 гг. основы новой эволюционной и популяционной биологии, базирующейся на теориях Менделя и Дарвина, были С. Райт (S. Wright), Дж. Холдейн (J. Haldane), Н. П. Дубинин и Д. Д. Ромашов (дополнение 18.1).

Многие факторы могут изменять частоты аллелей в популяциях: естественный отбор, мутации, генные миграции, генетический дрейф и неслучайные скрещивания.

Действие естественного отбора может приводить к тому, что носители одних генотипов оставят потомков больше, чем носители других, и это вызовет изменение генетической структуры популяции. Отбор означает дифференциальную вероятность оставления потомства разными особями или группами особей. Вероятность оставить потомство детерминируется многими свойствами организма: его жизнеспособностью, быстротой достижения репродуктивного возраста, продолжительностью репродуктивного периода, способностью к скрещиванию, плодовитостью. Совокупность этих свойств называется приспособленностью особи к условиям среды, в которой они обитают. Действие отбора состоит в том, что некоторые группы особей, генотипически отличающиеся от других, частично или полностью устраняются из размножения, так что на генетическое строение популяции будущего поколения оказывает влияние только оставшаяся часть популяции. Если вероятность оставления потомства особями с генотипом *aa* на 10 % меньше, чем особями с генотипом *AA* или *Aa*, то приспособленность (W) этих двух групп записывают так: для особей *AA* или *Aa* $W = 1$, для особей *aa* $W = 0{,}9$. Мерилом интенсивности отбора служит разница приспособленности сравниваемых групп, называемая коэффициентом отбора (S). Для только что приведенного примера $S = W_{AA} - W_{aa} = 1{,}0 - 0{,}9 = 0{,}1$.

Мутации. Сохранение даже относительного постоянства частоты генов возможно только

Дополнение 18.1

Существование наследственной изменчивости в природных популяциях послужило исходным пунктом в цепи аргументов, приведенных Ч. Дарвином для доказательства того, что эволюция происходит путем естественного отбора. По Дарвину, некоторые из наследственных изменений обеспечивают их носителям больший успех в выживании и размножении по сравнению с другими. В результате этого полезные изменения в ряду поколений будут накапливаться, а вредные вытесняться. Это и называется процессом естественного отбора.

Однако в начале 1900-х гг. наметилось противостояние дарвинизма и зарождающейся генетики. Согласно теориям Г. де Фриза и В. Иогансена, господствующее прежде представление о всемогуществе естественного отбора отвергалось, и ему оставляли лишь сортирующую роль. К тому же факты существования наследственной изменчивости в популяциях диких животных и растений не были известны. Во второй половине 1920-х гг. были сделаны первые шаги по объединению дарвиновской теории эволюции с принципами менделевской генетики. Результат этого объединения известен как синтетическая теория эволюции.

С. С. Четвериков (см. рис. 1.18) был первым исследователем, сделавшим шаг к сближению дарвинизма и генетики. В своей статье «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики», опубликованной в 1926 г., он дал единую концепцию эволюционного процесса на основе менделирования, мутирования и отбора. Он показал, что свободное скрещивание (или панмиксия) в популяции служит механизмом стабилизации в ней частот генотипических классов гомозигот и гетерозигот. Установление такого равновесного соотношения частот генотипов, по Четверикову, должно иметь следствием накопление в популяции огромного фонда скрытых мутаций. «...Вид, как губка, впитывает в себя гетерозиготные геновариации (мутации), сам оставаясь при этом внешне (фенотипически) однородным», — писал он. Тем самым снималось одно из существенных возражений в отношении дарвинизма — тезис о нехватке материала для действия отбора. С. С. Четвериков обратил внимание на значение колебаний численности популяций и на возникновение между ними изолирующих барьеров как на важные факторы эволюции. Он особо подчеркивал активную роль отбора: «...благодаря деятельности свободного скрещивания и отбора в условиях менделевской наследственности, каждое даже слабое улучшение в организме имеет определенный шанс распространиться на всю массу индивидов, составляющих свободно скрещивающееся сообщество (вид). ...Дарвинизм, — заключает Четвериков, — получил благодаря менделизму совершенно неожиданную и мощную поддержку».

За год до этой публикации большая группа молодых исследователей (Б. Л. Астауров, Н. К. Беляев, С. М. Гершензон, П. Ф. Рокицкий, Д. Д. Ромашов) под руководством С. С. Четверикова выехала в экспедиции в южные районы Советского Союза для экспериментальной проверки гипотезы о существовании мутаций в природных популяциях дрозофилы. Уже в 1927 г. первые результаты этого анализа популяций дрозофилы на Северном Кавказе были доложены Четвериковым на V международном генетическом конгрессе в Берлине. Они продемонстрировали насыщенность популяций рецессивными мутациями. Начиная с 1930 г. экспериментальными исследованиями популяций занимается Н. П. Дубинин.

В 1927 г. А. С. Серебровский предложил очень важный для генетики популяций термин — «генофонд», под которым понимал всю полноту генетических потенций популяций, как природных, так и искусственных (породных и сортовых). Аналогичный термин («gene pool») в англоязычной литературе был предложен Ф. Г. Добржанским в 1951 г.

В начале 30-х гг. на протяжении нескольких лет появился ряд исследований, заложивших краеугольные камни в здание теории современной генетики популяций. В 1930 г. появилась работа Р. Фишера «Генетическая теория естественного отбора» (R. A. Fisher, «The genetical theory of natural selection»), в 1931 г. — работы Н. П. Дубинина «Генетико-автоматические процессы и их роль в процессах эволюции» и С. Райта «Эволюция в менделевских популяциях» (S. Wright, «Evolution in mendelian populations»), в 1932 г. — Дж. Холдейна «Факторы эволюции» (J. Haldane, «Factors of evolution») и Н. П. Дубинина и Д. Д. Ромашова «Генетическое строение вида и его эволюция». В этих работах

при условии, что они не мутируют. Однако известно, что это не так.

Мутации постоянно возникают в популяциях и тоже сдвигают равновесие аллелей. Изменчивость в популяциях выявляют с помощью огромного количества приемов и методов, начиная от анализа цвета надкрылий божьих коровок или числа и формы полос на раковинах улиток, огромного объема данных по полиморфизму в электрофоретической подвижности ферментов, выявляемому в крахмальном геле, до анализа варьирования первичной структуры ДНК, как ядерной, так и неядерной (например митохондриальной), варьирования рестрикционных фрагментов.

Уже в первых исследованиях природных популяций, проведенных под руководством С. С. Четверикова, было показано, что под внешне нормальным фенотипом диких особей, живущих в природе, скрывается удивительная

были заложены основы экспериментального анализа проблемы генетики популяций. И наконец, в 1937 г. Ф. Г. Добржанский опубликовал книгу «Генетика и происхождение видов» (T. G. Dobzhansky, «Genetics and the origin of species»), которая, как многие считают, положила начало современной синтетической теории эволюции. В дальнейшем, во всей литературе, кроме русскоязычной, только Ф. Добржанский, Р. Фишер, С. Райт и Дж. Холдейн и стали считаться основоположниками генетики популяций и синтетической теории эволюции. Как будто и не было вклада российских генетиков.

Вот что пишет о С. С. Четверикове Ф. Г. Добржанский: «Плодотворные идеи часто восхитительно просты и не требуют многих страниц для их выражения. Грегор Мендель — основатель генетики. Он опубликовал только одну статью в 1865 г., которая сделала его одним из крупнейших ученых всех времен. Его другие статьи имеют не более чем биографический интерес. Четвериков также опубликовал одну статью, которая позволила занять ему почетное место в истории генетики. Название четвериковской классики в свободном переводе на английский звучит как „On certain aspects of the evolutionary process from the standpoint of genetics“. Она была опубликована на русском языке во втором томе „Журнала экспериментальной биологии“ (с. 3–54) в 1926 г. Короткое 2-страничное резюме на английском языке мало облегчило восприятие этой статьи за пределами России. Только в 1959 г. отдельные пассажи его статьи на английском языке были опубликованы в качестве приложения к статье Ф. Добржанского в издании трудов симпозиума „Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology“ (т. 24). Полный перевод на английский (перевел M. Barker, редактор M. Lerner) появился в 1961 г. в „Proceedings of the American Philosophical Society“ (т. 105). Вместе с Р. Фишером, С. Райтом и Дж. Холдейном, хотя и независимо от них, Четвериков четко, хотя и без элегантной математической утонченности, сформулировал основные принципы того, что позже стало известно как биологическая, или синтетическая, теория эволюции. Делались попытки на основании только даты публикации объявить в этом приоритет Четверикова. Сходные попытки делались в пользу Фишера. Споры такого рода являются верхом тщетности. Все четверо пришли к похожим идеям независимо, все четверо являются основоположниками, и это почетно для всех четверых. Четвериков не имел возможности широко распространить свои идеи не только за пределами, но даже и в самой России. Это не было его виной, так как его научная деятельность была грубо оборвана. Тем более было бы недобрым по отношению к нему, если бы мы попытались игнорировать его сейчас.

<…> Статья Четверикова 1926 г., хотя в ней отсутствует математическая аккуратность, восхитительна по ясности рассуждений. В ней доказывается (говоря современным языком), что мутационный процесс является источником исходного материала для эволюции, а не самой эволюции. Прекрасно в работе проанализированы следствия смешивания и неполного наследования, т. е. возражения Дженкина Дарвину против закона Харди (Четвериков был не знаком с вкладом Вайнберга). Сформулированы концепции генной частоты и генофонда (хотя и не даны этим понятиям названия). В ходе обсуждения географической изоляции популяций Четвериков близко подходит к понятию (хотя и не описывает его) случайного генетического дрейфа. Естественный отбор, по Четверикову, является ведущим фактором эволюционных преобразований, изменяющим частоты генов и заменяющим одни аллели на другие. Обсуждается значение полиморфизма (а не гетерозиса как одной из причин отбора), подчеркивается важность плейотропного действия гена.

Будучи экспериментатором и теоретиком, Четвериков из своих теоретических рассуждений вывел экспериментально проверяемые предсказания. Он предсказал существование того, что сейчас известно как генетический груз. Имея преимущество мудрости задним числом, нам сейчас трудно понять, как некоторые биологи 40 лет назад считали мутантов лабораторными артефактами, которых невозможно найти в популяциях. Четвериков и его сотрудники решили найти мутантов в природе. На базе теоретических соображений они разработали метод инбридинга и использовали его для анализа популяций *Drosophila melanogaster*. Мутантов находили весьма часто, большинство из них были рецессивными, скрытыми в гетерозиготном состоянии» [Dobzhansky, 1967].

картина громадной наследственной изменчивости. У нормальных по внешнему виду особей множество хромосом были носителями мутаций: летальных, полулетальных, субвитальных, мутаций, влияющих на фертильность, морфологию, окраску, длительность жизни и др. Каждая особь из популяции имела по нескольку таких мутаций. Насыщенность популяции мутациями, снижающими ее приспособленность, называется генетическим грузом. Он определяется как среднее число летальных мутаций на одну особь из данной популяции.

Если аллель *A* мутирует с определенной скоростью в *a*, то очевидно, что в генофонде популяции постепенно в ряду поколений частота аллеля *A* будет уменьшаться на число измененных генов, а частота аллеля *a* возрастет на эту же величину. Это естественно приведет к нарушению равновесия в популяции, к изменению ее генетического состава.

Генными миграциями называют перемещение аллелей в популяцию и из нее. В результате миграций в популяцию вносятся совершенно новые аллели или значительно изменяются частоты уже существующих.

Генетический дрейф. Как уже известно, правило Харди–Вайнберга выполняется только в том случае, если популяция достаточно велика. Это совершенно необходимо, поскольку уравнение зависит от законов вероятностей.

Явление генетического дрейфа было описано в 1931 г. одновременно и независимо друг от друга Н. П. Дубининым и Д. Д. Ромашовым в СССР и С. Райтом в Англии. Суть его состоит в том, что численность популяции может оказывать существенное влияние на ее генотипическую структуру. При резком уменьшении численности популяции, например при массовой гибели особей во время необычно холодной зимы, в силу случайных причин могут сохраниться носители редких уклонений. Они станут исходной формой при последующем возрастании численности популяции, что приведет к их широкому распространению, по существу не обусловленному реальной селективной ценностью.

Дубинин и Ромашов назвали это явление генетико-автоматическими процессами, а Райт — дрейфом генов.

Например, частота аллеля *a* в популяции составляет 1 %. В популяции из 1 миллиона особей присутствует 20 000 аллелей *a* (1 млн особей имеют 2 млн аллелей этого гена, 1 % составляет 20 000). Однако в маленькой популяции, состоящей из 50 особей, присутствует только одна копия аллеля *a*. Если особь, несущая этот аллель, не сможет оставить потомство, аллель *a* будет полностью потерян. Аналогичным образом, если погибнут 10 из 49 особей, не имеющих аллеля *a*, его частота повысится с 1 % до 1,25 %. Это изменение в составе генофонда под действием случайных обстоятельств носит название генетического дрейфа. Можно выделить две разновидности дрейфа: эффект основателя и «бутылочное горлышко».

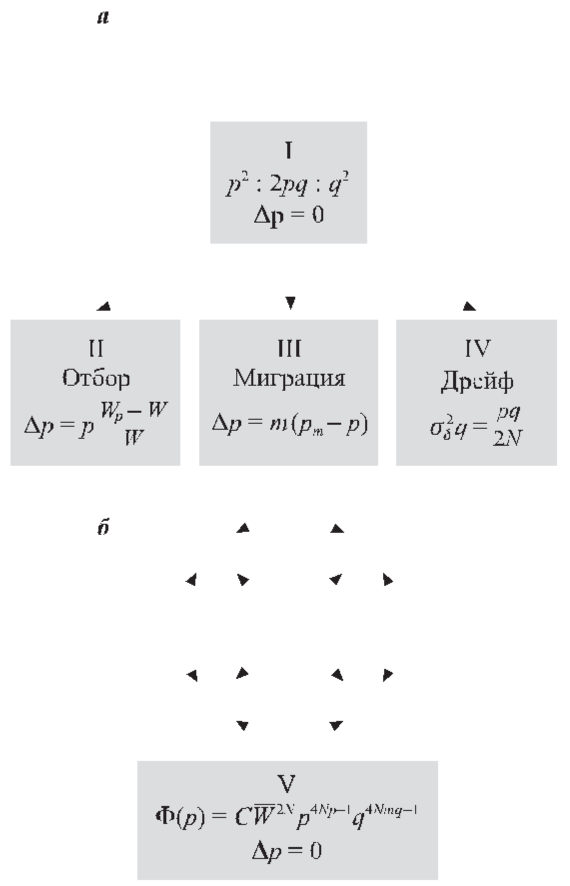
Эффект основателя. Малая популяция, которая возникает из большей, может представлять, а может и не представлять генетический состав этой большой популяции. Некоторые аллели, редко встречающиеся в большой популяции, в малой популяции могут отсутствовать совсем или быть сверхпредставлены. В результате даже тогда, когда эта малая популяция начнет численно увеличиваться, она будет иметь другой генетический состав — другой генофонд по сравнению с родительской группой (популяцией). Это явление называется эффектом основателя.

«Бутылочное горлышко». Это другой тип генетического дрейфа, он встречается тогда, когда популяция резко уменьшается в численном составе под действием событий, не имеющих отношения к обычным факторам естественного отбора.

Неслучайные скрещивания. Нарушения уравнения Харди–Вайнберга могут происходить из-за неслучайных скрещиваний.

Влияние основных факторов на структуру популяций описывается следующими формулами (рис. 18.3).

Рисунок 18.3



Основные математические модели популяционной генетики [Алтухов, 1995]:

а — панмиктическая популяция неограниченной численности, остающаяся в стабильном состоянии ($\Delta p = 0$) в отсутствие отбора (W), миграции (m) и случайного дрейфа генов (N) (I — правило Харди–Вайнберга; II, III, IV — элементарные формулы для отбора, миграции и случайного дрейфа генов как основных факторов, определяющих динамику частот генов в популяциях); *б* — подразделенная популяция, представленная совокупностью субпопуляций, испытывающих одновременное воздействие случайного дрейфа и миграции генов, а также естественного отбора (V — математическая функция С. Райта для распределения частоты гена в такой популяции)

Литература

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 72–166.

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 359–375.

Алтухов Ю. П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // Соросовский образовательный журн. 1995. № 1. С. 32–43.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 419–440.

Дубинин Н. П. Генетико-автоматические процессы и их значение для механизма органической эволюции // Избранные труды. В 4 т. Т. 1. Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 202–220. (Журн. эксперим. биол. 1931. Т. 7, вып. 5–6. С. 463–479).

Дубинин Н. П. Генетика // Развитие биологии в СССР. М.: Наука, 1967. С. 583–597.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 334–372.

Дубинин Н. П., Глембоцкий Я. Л. Генетика популяций и селекция. М.: Наука, 1967. 591 с.

Дубинин Н. П., Ромашов Д. Д. Генетическое строение вида и его эволюция // Дубинин Н. П. Избранные труды. В 4 т. Т. 1. Проблемы гена и эволюции. М.: Наука, 2000. С. 221–272. (Биол. журн. 1932. Т. 1, вып. 5–6. С. 52–95).

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 454–475.

Кайданов Л. З. Генетика популяций. М.: Высш. шк., 1996. 320 с.

Лобашев М. Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 603–632.

Тимофеев-Ресовский Н. В., Яблоков А. В., Глотов Н. В. Очерк учения о популяции. М.: Наука, 1973. 277 с.

Четвериков С. С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Классики советской генетики: 1920–1940. Л.: Наука, 1968. С. 133–170. (Журн. эксперим. биол. 1926. Сер. А. Т. 2, вып. 1. С. 3–54).

Dobzhansky T. G. Sergey Sergeewich Tshetverikov, 1880–1959 // Genetics. 1967. Vol. 55. P. 1–3.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 714–771.

Глава 19
ИНБРИДИНГ И ГЕТЕРОЗИС

19.1. ИНБРИДИНГ

В основном популяции представляют собой группы животных или растений, свободно размножающихся половым путем. В природе особи гетерозиготны по многим генам, в силу чего в популяциях при свободном скрещивании идет непрерывная внутрипопуляционная гибридизация со сложным расщеплением, возникновением гомозигот и появлением особей, являющихся сложными гетерозиготами. Многообразная гетерозиготность, общая сложность генетической природы популяций ярко обнаруживаются, когда в экспериментальных условиях растения из популяций перекрестников, например рожь, кукуруза, подсолнечник и т. д., в ряде поколений начинают подвергаться принудительному самоопылению. Получение потомства от скрещивания родственных между собой особей называется инбридингом. Родственными называют скрещивания особей, имеющих близкую степень родства: брат–сестра, отец–дочь, мать–сын, двоюродные братья и сестры. В результате самоопыления, как это в свое время теоретически показал Г. Мендель, возникают чистые, т. е. гомозиготные, линии. Гены, бывшие у особей исходной популяции в гетерозиготном состоянии, переходят в гомозиготное состояние, по-разному сочетаясь в разных чистых линиях.

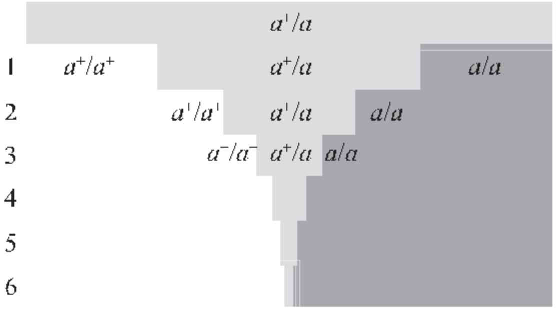
На рис. 19.1 представлены результаты теоретического анализа, выполненного Г. Менделем. Мы видим, что уже в первом поколении при крайней степени инбридинга — самоопылении популяция распадается на три группы особей: 25 % *AA* + 50 % *Aa* + 25 % *aa*. Если в исходном поколении мы имеем 100 % гетерозигот и 0 % гомозигот, то в F_1 доля гетерозигот равна 50 %. Особи F_2 включают потомков как от чистых гомозигот (*aa*, *AA*), так и от гетерозигот (*Aa*). В итоге особи F_2 представлены тремя классами (*Aa*, *AA*, *aa*), но гетерозигот будет только 25 %. Этот процесс расщепления гетерозигот осуществляется в каждом поколении, что ведет к нарастанию доли гомозигот и к уменьшению доли гетерозигот. Легко установить, что этот процесс падения частоты гетерозигот описывается формулой $(1/2)^n$, где *n* — число поколений самоопыления. Для шестого поколения самоопыления (рис. 19.1) доля гетерозигот составит $(1/2)^6$, или 1/64.

Результатом инбридинга обычно является ослабление жизнеспособности. Представим, что аллель *a* имеет летальное действие или снижает жизнеспособность. Очевидно, что в каждом поколении инбридинга 25 % особей *aa* либо будут вымирать, либо будут сильно ослабленными. В результате инбридинг в ряду поколений приводит к депрессии.

В связи с тем что каждый перекрестноопыляющийся сорт насыщен различными вредными рецессивными мутациями, то естественно, что при инбридинге проявляется понижение жизнеспособности, урожайности, устойчивости к заболеваниям, уменьшение размеров, возникают уродства.

Кукуруза и рожь — типичные перекрестноопыляющиеся растения, однако их можно принудить к самоопылению. У ржи этого легко достигнуть, прикрыв колосья накануне цветения изоляционными мешочками. При этом семена завязываются очень слабо, и лишь у очень незначительной части растений они вообще

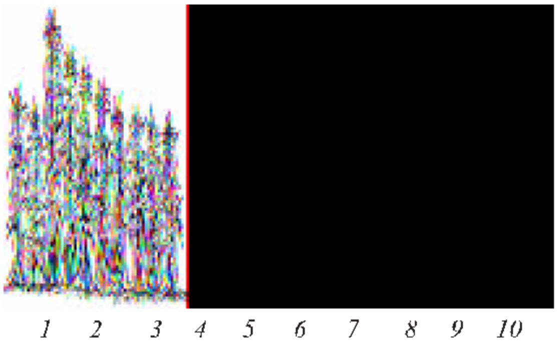
Рисунок 19.1



Теоретический анализ последствий самоопыления по Г. Менделю (1–6 — поколения) [Дубинин, 1970. С. 124].

Вследствие инбридинга популяция распадается на гомозигот по обоим аллелям

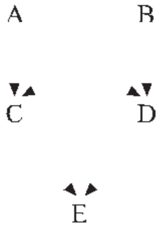
Рисунок 19.2



Влияние на высоту растения аутбредного скрещивания двух инбредных линий кукурузы и последующего самоопыления в течение восьми поколений [Jones, 1924]:

1, 2 — типичные растения родительских линий, *3–10* — представители всех последующих поколений. Все растения выращены одновременно в одинаковых условиях

Рисунок 19.3



Родословная потомства от скрещивания между братом и сестрой [Айала, Кайгер, 1988. С.169].

Каждая стрелка соответствует передаче следующему поколению одной гаметы

образуются. Растения, выращенные из подобных семян, обладают меньшей жизнеспособностью по сравнению с исходным материалом. Если применять такой же инбридинг на протяжении нескольких последовательных поколений, то станут ясно заметны все более усиливающиеся признаки инбредного вырождения. Первое инбредное поколение, или I_1, полученное из семян исходной популяции растений, наиболее жизнеспособно, второе инбредное поколение I_2 в среднем уступает по жизнеспособности I_1, и в дальнейшем аналогично этому средняя жизнеспособность уменьшается от поколения к поколению, пока не будет достигнут инбредный минимум. Эта стадия, достигаемая обычно в результате инбридинга на протяжении примерно 10 поколений, указывает, что жизнеспособность упала до самого низкого уровня и поэтому продолжение инбридинга не вызовет дальнейшего ухудшения. До того как будет достигнут инбредный минимум, многие инбредные линии, по крайней мере у ржи, вымрут либо из-за плохой жизнеспособности, либо потому, что образование семян в колосьях, заключенных в изоляционные мешочки, совершенно прекратилось. На рис. 19.2 (*1, 2*) показаны растения кукурузы при инбредном минимуме.

При изучении растений, выживших ко времени достижения инбредного минимума, обнаруживается, что разные линии угнетены в различной степени и сильно отличаются одна от другой по плодовитости и внешним признакам. Следовательно, инбридинг вызвал дифференциацию исходной популяции. Материал, достигший инбредного минимума, состоит из ряда различных константных линий. Из перекрестноопыляющейся популяции можно вывести практически безграничное число инбредных линий, различающихся по всевозможным признакам. Причина дифференциации и константности инбредных линий, так же как и чистых линий у самоопыляющихся растений, одна и та же — гомозиготность.

Из всего сказанного об инбридинге становится очевидным, что необходим какой-то критерий, позволяющий судить о том, насколько инбридирована та или иная особь, что позволяет оценивать степень ее гомозиготности. Таким критерием служит коэффициент инбридинга (F), который отражает вероятность того, что у какой-либо особи в данном локусе окажутся два аллеля, идентичные по происхождению, т. е. точные копии аллеля, находившегося в генотипе одного из прародителей этой особи в каком-то из предшествовавших поколений. Он вычисляется по формуле

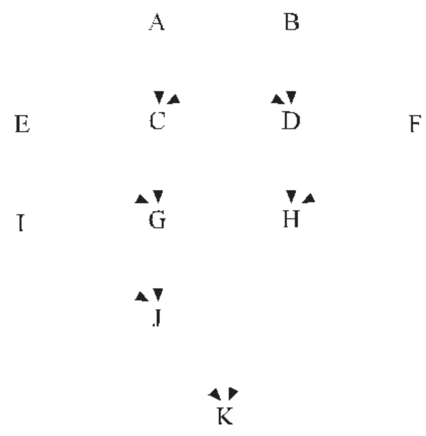
$$Fx = (1/2)^{ns + nd + 1} \times (1 + FA),$$

где Fx — коэффициент инбридинга исследуемой особи, ns — число поколений от отца до общего предка A, включая и его самого, nd — число поколений инбридинга от матери до A (включая и его самого), FA — коэффициент инбридинга общего предка. Если общий предок не инбридирован или ничего не известно о его родословной (т. е. можно предполагать, что в ней не было инбридинга), то $FA = 0$ и $Fx = (1/2)^{ns + nd + 1}$.

Определим значение коэффициента инбридинга F в потомстве сибсов, т. е. особей, имеющих одну и ту же мать и одного и того же отца, т. е. родных братьев и сестер. На рис. 19.3 показана схема скрещивания, или родословная, для этого случая.

Пусть A и B — не состоящие в родстве родители, из гамет которых образуются зиготы C и D. Зигота E возникает при слиянии га-

Рисунок 19.4



Родословная потомства от скрещивания между двоюродными дядей (теткой) и племянницей (племянником) [Айала, Кайгер, 1988. С. 169]

мет от C и D, т. е. от сестры и брата. Поскольку A и B не состояли в родстве, можно считать, что их аллели в определенном локусе не идентичны по происхождению. Эти аллели у особи A можно обозначить *a1a2*, а у особи B — *a3a4* (разные индексы указывают лишь на то, что аллели не являются идентичными по происхождению). Вероятности появления четырех типов потомков от скрещивания A × B (*a1a3*, *a1a4*, *a2a3*, *a2a4*) равны и составляют 1/4. От скрещивания сибсов (E) появятся особи, гомозиготные по любому из аллелей, с вероятностью 1/4. Эта величина является произведением вероятности появления гомозигот по одному из аллелей (*a1*, *a2*, *a3*, *a4*), каждая из которых составляет 1/16, на число аллелей.

На рис. 19.4 показана более сложная схема близкородственного скрещивания между двоюродными дядей (теткой) и племянницей (племянником).

Для таких и более сложных случаев используют анализ путей (или путевой анализ), позволяющий определять коэффициент инбридинга для любого организма с известной родословной. Этот метод основан на подсчете числа стрелок в родословной, образующих замкнутые циклы, включающие анализируемую особь и всех предков, общих для обоих родителей. В родословной, изображенной на рис. 19.4, A и B — два предка, общие для обоих родителей H и J. В этом случае есть два пути: K–J–G–C–A–D–H–K и K–J–G–C–B–D–H–K, состоящие из семи этапов каждый. Поскольку K появляется дважды в каждом пути, число этапов и в этом, и в другом пути сокращается на единицу. Коэффициент инбридинга равен сумме слагаемых, каждое из которых определяется числом этапов в соответствующем пути и равно $(1/2)^n$, где n — число этапов минус единица. Для нашей родословной (рис. 19.4) вклад каждого из путей составляет $(1/2)^6 = 1/64$ и, значит, коэффициент инбридинга $F = 1/64 + 1/64 = 1/32$.

По подобной схеме определены коэффициенты инбридинга для потомства от скрещивания особей, состоящих в различных степенях родства [Айала, Кайгер, 1988. С. 170]:

Самоопыление	1/2
Сибсы (братья и сестры)	1/4
Дядя × племянница, тетка × племянник или «двойные» двоюродные братья и сестры	1/8
Двоюродные братья и сестры	1/16
Троюродные братья и сестры	1/64
Троюродные дядья × племянницы или тетки × племянники	1/128
Четвероюродные братья и сестры	1/256

Опыты по инбридингу в большом масштабе проводили также на крысах, морских свинках, дрозофиле. Поскольку у животных возможность самооплодотворения исключена, то наиболее эффективным является скрещивание братьев и сестер, так называемое спаривание сибсов. Если спаривание сибсов повторяется на протяжении нескольких поколений, то оно постепенно приводит к инбредному минимуму такого же типа, как и у растений. Но при спаривании сибсов для получения полной или почти полной гомозиготности, характерной для материала, достигшего инбредного минимума, необходимо большее число поколений, чем при самоопылении.

У дрозофил после 330 поколений инбридинга с отбором на быстрое или медленное развитие были получены инбредные линии, в которых имаго вылупляются из куколок (при 25 °C) на 7-й день после откладки яиц (быстрое развитие) или на 13-й день (медленное развитие) при нормальном развитии в 10 дней [Loreto et al., 1988].

У человека супружеские отношения между родителями и детьми или между братьями и сестрами называются кровосмешением. В большинстве человеческих культур существует запрет на подобные браки. Уже в Библии Моисей предлагает своему народу правила, запрещающие половые отношения с любыми людьми, близкими по плоти: дедов с внучками, племянников с тетками, других близких родственников, даже не состоящих в кровном родстве.

Однако близкородственные браки все же случаются на протяжении всей истории чело-

вечества. Удивительную сводку о распространении в близкородственных браках различных недостатков и уродств дал основоположник Томского университета Василий Флоринский в книге, вышедшей в 1865 г. Он исследовал случаи распространения глухонемоты в человеческих популяциях. При анализе частоты рождаемости глухонемых в разных государствах Европы обнаружили, что упомянутая болезнь при кровосмешении развивается в 12–15 раз чаще, чем при браках неродственных. Если число глухонемых, родившихся от нормального брака, принять за единицу, то опасность глухонемоты для браков между двоюродными братьями и сестрами, дядьями и племянницами, племянниками и тетками составит 18–70.

В 1861 г. было проведено исследование берлинских евреев, у которых по причине малочисленности популяции и большей терпимости законов бракосочетания кровные браки заключаются гораздо чаще, чем у христиан. Из 341 глухонемого, находившегося в то время в Берлинском институте, было 42 еврея. Если учесть общую пропорцию численности христиан и евреев, то оказывается, что один глухонемой приходится на 1477 христиан и на 368 евреев. Похожие различия в частоте этой болезни у евреев и христиан обнаружены в Париже и Каире.

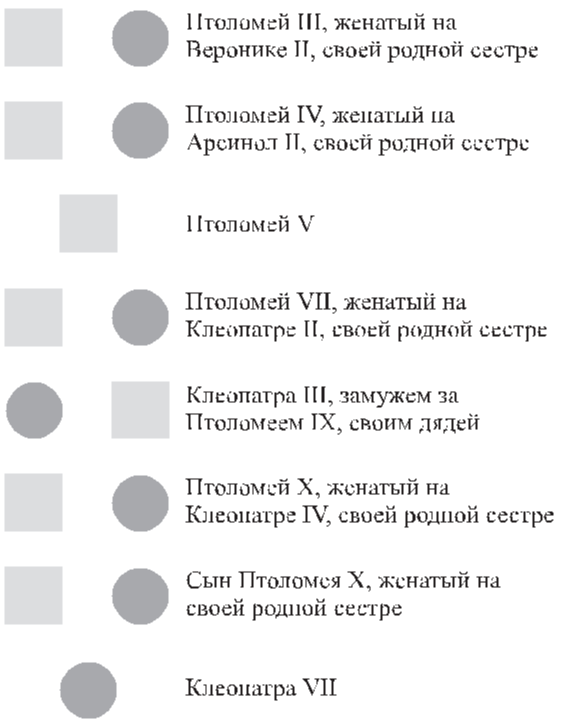
Обширные исследования глухонемоты проведены в различных провинциях США среди белых и негров, находившихся в то время в рабстве. Оказалось, что у последних эта болезнь встречается в 91 раз чаще. Эту огромную разницу объясняют влиянием рабства: рожденные от матерей-рабынь и хозяев-рабовладельцев, дети также оставались рабами, как и их матери. Эти дети по закону не считались родственниками, так как они даже не знали, что приходятся друг другу братьями и сестрами, и, естественно, могло случиться, что они женились между собой.

Многие другие пороки также имеют большее распространение в результате кровосмешения, например, при изучении 4013 детей от 883 кровных браков в США доля детей, имевших различные врожденные пороки, составила 61 %. Среди отклонений, выявляемых в близкородственных браках, находят альбинизм, слабоумие, идиотизм, бесплодие.

Обширная литература о роли инбридинга в выявлении различных наследственных заболеваний у человека накоплена к настоящему времени.

Известная степень инбридинга встречается довольно часто в изолятах. Так называют не-

Рисунок 19.5



Часть родословной Клеопатры VII, правительницы Египта, возлюбленной Юлия Цезаря и Марка Антония, известной своей красотой и умом [Гершензон, 1983. С. 485]

большие группы населения, в силу разных причин изолированные от основной массы населения и вынужденные поэтому вступать в брак преимущественно с лицами, принадлежащими к тому же изоляту. Типичные примеры — жители островов и отдельных долин. В этих изолятах наследственные дефекты или болезни часто более распространены, чем в основной популяции.

Обратившись опять к книге Флоринского 1865 г., находим: «В некоторых местностях шестипалость является как недостаток, свойственный почти всему народонаселению. Так, например, было в деревне Изо, в департаменте Изер (Франция), которая по своему положению была совершенно изолирована от других селений. Жители этой бедной деревни в продолжение долгого времени не вступали в супружеские сношения с соседними жителями, роднились между собой и часто женились на родственницах. Вследствие этого, к концу прошлого столетия, в помянутой деревне начало родиться много шестипалых, а в течение 35–40 лет такими сделались почти все жители. Как мужчины, так и женщины имели по 6-му пальцу на руках и ногах. Еще более замеча-

тельно то обстоятельство, что как скоро в деревню Изо начала проникать помесь крови, когда при устроившихся путях сообщения эти жители стали вступать в сношения с окрестным народонаселением, излишние пальцы в следующих смешанных поколениях начали пропадать» [Флоринский, 1995. С. 105].

Однако угнетающее действие инбридинга проявляется не всегда. Многие растения постоянно и без всяких признаков депрессии размножаются исключительно или преимущественно самоопылением, например пшеница, овес, рис, горох, табак, томаты и др. У лабораторных животных (мыши, крысы), у которых инбридинг большей частью приводит к вредным последствиям, в отдельных случаях даже очень длительный (50–70 поколений) тесный инбридинг не приводил к сколько-нибудь заметным отрицательным результатам.

Многие породы животных выведены в результате близкородственных скрещиваний. С помощью инбридинга еще в XIX в. были получены чистокровная английская скаковая лошадь, породы дюргамского быка, дишлейского барана и т. д.

Для человека инбридинг, как правило, вреден, но известны примеры длительного и тесного инбридинга, не сопровождавшегося вырождением, в частности в династиях египетских фараонов (рис. 19.5).

19.2. ГЕТЕРОЗИС

Скрещивание между неродственными особями, или аутбридинг, по своим генетическим следствиям прямо противоположно инбридингу. Аутбридинг повышает гетерозиготность потомков, объединяет в гибридах аллели, существовавшие у родителей порознь. Вредные рецессивные гены, находившиеся у родителей в гомозиготном состоянии, подавляются у гетерозиготных по ним потомков. Поэтому гибриды первого поколения часто оказываются более жизнеспособными, плодовитыми и продуктивными, чем родители, т. е. проявляют гибридную мощность. В 1914 г. Дж. Шелл предложил гибридную мощность называть гетерозисом. Дальнейшие скрещивания этих гибридов внутри себя ведут к затуханию гетерозисного эффекта (см. рис. 19.2).

В сельском хозяйстве давно используют гетерозис (табл. 19.1). В особенно большом масштабе используют этот метод в США при разведении кукурузы. Обычно для этого применяют так называемый метод двойного скрещивания, который предусматривает комбинирование четырех инбредных линий — А, Б, В, Г (рис. 19.6). Вначале получают гибриды А × Б и В × Г, а затем полученные от них F_1 скрещивают между собой. Развитие этих технологий произвело в США в конце 30-х гг. настоящую революцию.

Производство гибридов садовых растений, размножающихся семенами, является одной из наиболее успешных технологий разведения растений, поскольку, во-первых, при этом используется гетерозис, во-вторых, создаются гомогенные линии, в-третьих, это легко позволяет коммерсантам-растениеводам контролировать распространение своей продукции. В США, по данным Дж. Дженика из Отдела садовых культур (Purdue University, West Lafayette, IN) за 1996 г., список культур, при посадке которых более чем на 50 % используются гибриды F_1, огромен. В него входят аспарагус (90 %), брокколи (100 %), брюссельская капуста (95 %), кочанная капуста, цветная капуста (50–75 %), морковь (90 %), огурцы (95 %), баклажаны, лук (65 %), тыква (50–70 %), шпинат (90 %), сладкая кукуруза (99 %), помидоры и свекла (70 %), арбузы (80 %).

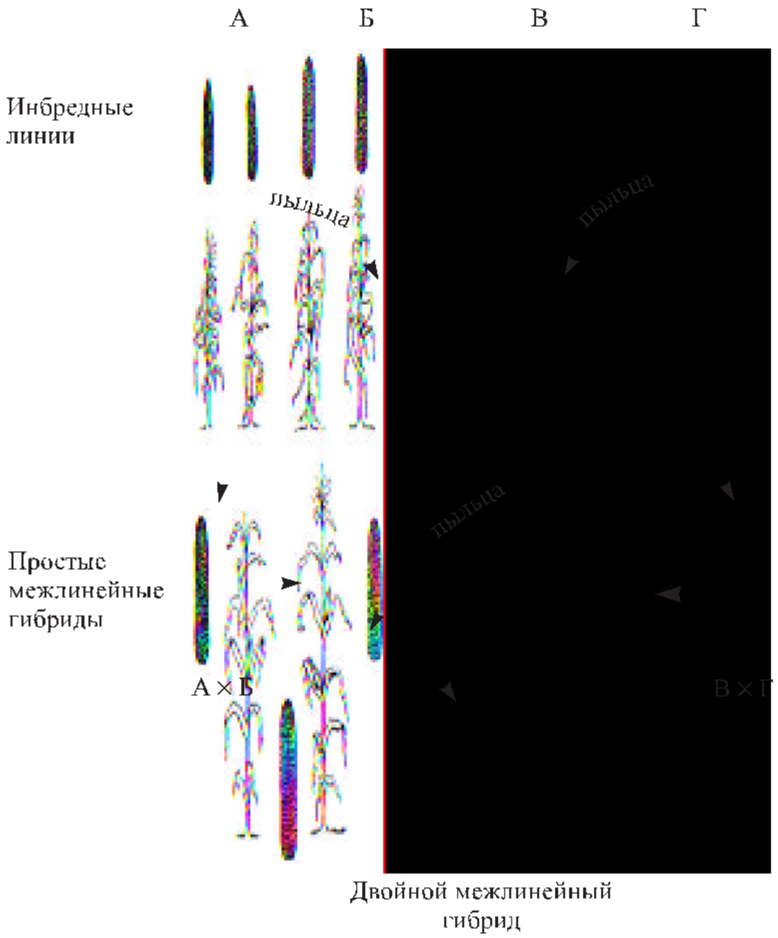
Гибриды также доминируют на рынке семян декоративных растений, таких как агератум, гвоздика, семенные сорта герани, африканские бархатцы, табак, петуния, примула, анютины глазки, львиный зев, циния и др.

Широко используется гетерозис и в животноводстве. По сведениям, приведенным в книге С. М. Гершензона [1983], у кур гибриды F_1, полученные от скрещивания двух довольно сильно инбридированных линий породы леггорн, превосходили родителей: по яйценоскости за 500 дней — на 22 яйца, по весу яйца —

Таблица 19.1. Прибавление урожайности у гетерозисных форм растений [Гершензон, 1983. С. 488]

Культура	Хозяйственный признак	Превышение над стандартным сортом (%)
Кукуруза	Урожай зерна	20–35
Свекла кормовая	Содержание сухого вещества в корне	25–30
Подсолнечник	Содержание масла в семенах	15
Табак	Урожай листьев	30–40
Томаты	Урожай плодов	45–50

Рисунок 19.6



Получение простых и двойных межлинейных гибридов при производстве семян гибридной кукурузы [Дубинин, 1970. С.371]

на 2 г, по весу взрослых кур — на 130 г. У шелкопряда шелконосность коконов межпородных гибридов на 10–15 % выше, чем у родительских пород. По данным этой же книги, в одной работе по гибридизации свиней было найдено, что средний вес поросенка при отъеме составлял для чистых пород 69,8 кг, для гибридов 88 кг и для трехпородных помесей 114,3 кг.

В 1908–1909 гг. американские кукурузоводы Дж. Шелл и Е. Ист предложили теорию, согласно которой гетерозиготность как таковая оказывает стимулирующее, а гомозиготность, наоборот, угнетающее воздействие на жизнеспособность. На основе ее Д. Джонс (D. Jones) в 1918 г. сформулировал первую гипотезу гетерозиса, полагавшую его причиной действие связанных доминантных генов. В последующие годы эта гипотеза развивалась и дополнялась и в современном варианте включает в себя по крайней мере четыре разных предположения о действии доминантных факторов в гетерозисном эффекте: 1) подавляющее действие доминантных факторов в отношении вредных рецессивов, 2) аддитивный эффект доминантных факторов в отношении вредных рецессивов, 3) неаллельное взаимодействие по типу эпистаза, 4) сверхдоминирование.

В целом гипотеза благоприятных доминантных факторов удовлетворительно объясняла многие случаи гетерозиса. Однако Дж. Кроу (J. Crow, 1948, 1952) рассчитал, что средняя прибавка в урожае популяции, где все вредные рецессивы были замещены их благоприятными доминантными аллелями, вряд ли значительно превысила бы 5 %, что существенно ниже прибавки, получаемой при гетерозисе. В настоящее время полагают, что причин возникновения гетерозиса много. Одной из них, по гипотезе В. А. Струнникова, является формирование компенсационных комплексов генов (ККГ). Суть состоит в том, что у особей, подвергшихся действию неблагоприятных ге-

нетических факторов в результате инбридинга и испытывающих глубокую гибридную депрессию, возникают хорошо скоординированные комплексы доминантных генов, главным образом в гомозиготном состоянии, которые компенсируют или погашают отрицательное действие указанных факторов. Например, если вести отбор на увеличение жизнеспособности в линии, несущей полулеталь в гомозиготе, жизнеспособность может увеличиться почти до нормы. В гибридах F_1 с участием этой линии сохраняется одна доза достаточно скоординированных генов комплекса, в то время как депрессирующее действие полулетали не проявляется в связи с переходом ее в гетерозиготное состояние. Накопление продукта большого числа благоприятных генов, теперь не ослабляемых полулеталью, приводит к резкому повышению жизнеспособности и мощному развитию тех признаков, которые в исходной линии были депрессированы. В F_2 компенсационный комплекс генов распадается и гетерозис не проявляется.

Исходя из исключительной хозяйственной ценности гетерозиса большое значение имеет расшифровка его механизмов, а также разработка методов его закрепления.

1. Закрепить гетерозис удается там, где возможно вегетативное размножение гибридов — клубнями, луковицами, черенками. Так сохраняется положительный эффект гетерозиса у картофеля.

2. В естественных условиях гетерозис закрепляется при возникновении полиморфизма по инверсиям.

3. Важным подходом к закреплению гетерозиса является кратное увеличение наборов хромосом — полиплоидия.

4. Аналогично опытам Гёрдона возможна пересадка ядер у животных (клеточная инженерия): ядра из соматических клеток, а их сколько угодно, можно пересадить в энуклеированные яйцеклетки.

Литература

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1988. С. 167–201.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 486–493.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 221–230.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 122–124, 369–372.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 557–560.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 660–666.

Мирюта Ю. П. Новые пути овладения гетерозисом у растений. Новосибирск: Изд. Ин-та цитологии и генетики СО РАН, 1991. 86 с.

Мюнтцинг А. Генетика, общая и прикладная. М.: Мир, 1967. С. 354–376.

Соколов В. А. Изучение механизмов гетерозиса: Дисс. … д-ра биол. наук. Новосибирск, 1992. 217 с. (Ин-т цитологии и генетики СО РАН).

Струнников В. А. Возникновение компенсационного комплекса генов — одна из причин гетерозиса // Журн. общ. биол. 1974. Т. 35. С. 666–677.

Струнников В. А. Природа гетерозиса и новые методы его повышения. М.: Наука, 1994. 107 с.

Флоринский В. М. Усовершенствование и вырождение человеческого рода. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1995. С. 94–119. (Напечатано с издания 1865 г.)

Jones D. F. The attainment of homozygosity in inbred strains of maize // Genetics. 1924. Vol. 9. P. 405–418.

Loreto E. L. S., Valente V. L. S., Oliveira A. K. Differential gene activation in *Drosophila melanogaster* populations selected for developmental rate // Rev. Brasil. Genet. 1988. Vol. 11. P. 519–534.

Глава 20
ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ

Исследования в области молекулярной генетики показали, что в основе наблюдаемой гомологии органов и физиологических функций лежит гомология генов и кодируемых ими белков. В самом деле, есть белки, которые имеют фактически одинаковые структуру и функции у каждого организма, живущего на Земле. Несмотря на то что у каждого вида накапливаются мутации в гене для этого белка и некоторые из них даже приобретают адаптивное значение, не возникает сомнения, что в том или ином варианте этот ген существует у всех форм. Образование мутаций в каждом гене происходит случайно, поэтому чем дольше два вида существовали отдельно от общего предка, тем больше вероятности, что в двух гомологичных генах накопились мутации. Число мутаций, выявляемых при сравнении гомологичных генов у двух разных видов, может служить мерой их эволюционного расхождения — «молекулярными часами».

Можно представить, что какой-то предок имел определенную последовательность ДНК. После того как от этого предка развились два новых организма, в их ДНК начали накапливаться независимые изменения. Например, как полагают, большинство групп млекопитающих выделилось от общего предка около 65 млн лет назад. Если сравнить последовательности нуклеотидов у мыши и человека, например в гене гормона роста, можно обнаружить, что они различаются по 20 нуклеотидам. Поэтому, чтобы определить скорость изменений в данном гене, нужно прежде всего подсчитать число замен нуклеотидов. Для того чтобы исключить из рассмотрения длину сравниваемых последовательностей, значения выражают в частоте замен на один сайт. Потом это значение делят на число лет, прошедших с момента расхождения. В нашем случае с геном гормона роста получается 4×10^{-9} замен на один сайт нуклеотида в год.

К настоящему времени установлено, что частота замен нуклеотидов может изменяться во времени, в разных частях гена и в зависимости от функциональной нагрузки на ген.

1. Разные части гена изменяются с разной скоростью (табл. 20.1): наибольшая скорость отмечена для последовательностей, имеющих минимальное влияние на функционирование (псевдогены и интроны, а также замены-синонимы).

Таблица 20.1. Частота замен в последовательностях нуклеотидов ДНК у млекопитающих [Russell, 1998. P. 760]

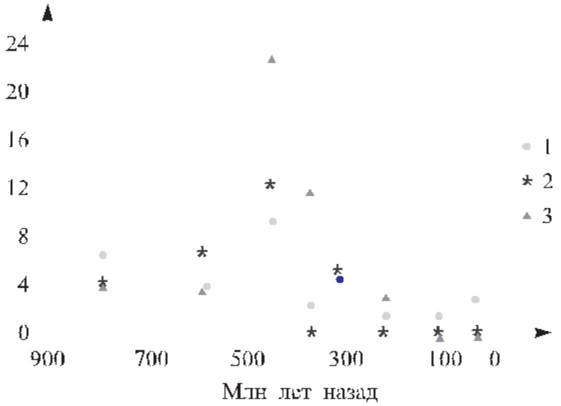
	Последовательности	Частота замен нуклеотидов на один сайт в год ($p \times 10^9$)
Функциональные гены	5′-район гена (регуляторная некодирующая зона)	2,36
	Лидерная нетранслируемая зона	1,74
	Кодирующая часть гена (замены-синонимы)*	4,65
	Кодирующая часть гена (замены-несинонимы)	0,88
	Интрон	3,70
	Трэйлерная нетранслируемая часть гена	1,88
	3′-некодирующая часть гена	4,46
Псевдогены		4,85

* Замены-синонимы не изменяют аминокислоты в молекуле белка, замены-несинонимы — изменяют.

Таблица 20.2. Различия в частоте замен нуклеотидов в последовательностях некоторых генов млекопитающих в зависимости от типа замен

Кодируемый белок	Частота замен нуклеотидов на один сайт в год ($p \times 10^{9}$)	
	Замены-несинонимы	Замены-синонимы
Гистон Н4	0,004	1,43
Инсулин	0,16	5,41
Пролактин	1,29	5,59
α-Глобин	0,56	3,94
β-Глобин	0,87	2,96
Альбумин	0,92	6,72
α-Фетопротеин	1,21	4,90

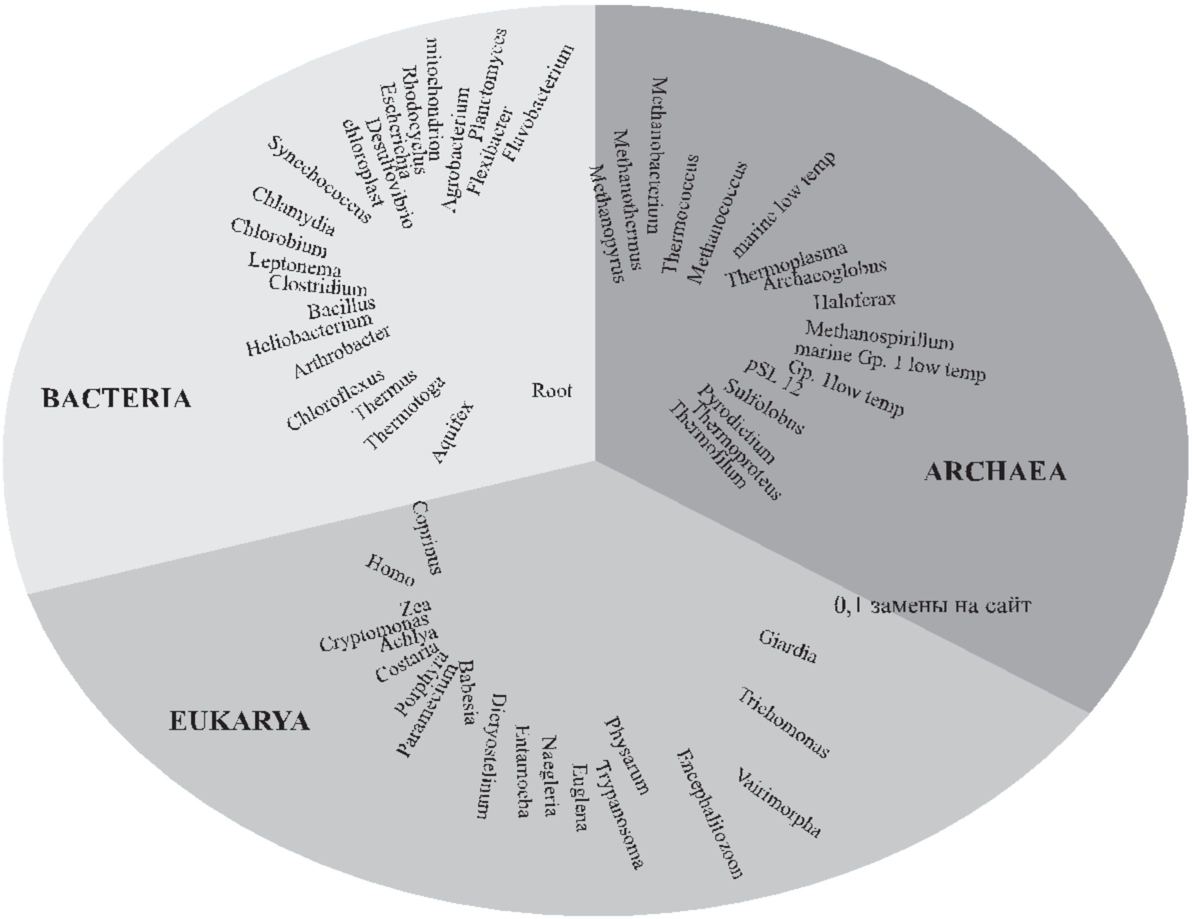
Рисунок 20.1



Изменение скорости фиксации замен аминокислот в гемоглобинах у позвоночных животных [Ратнер, 1999]:

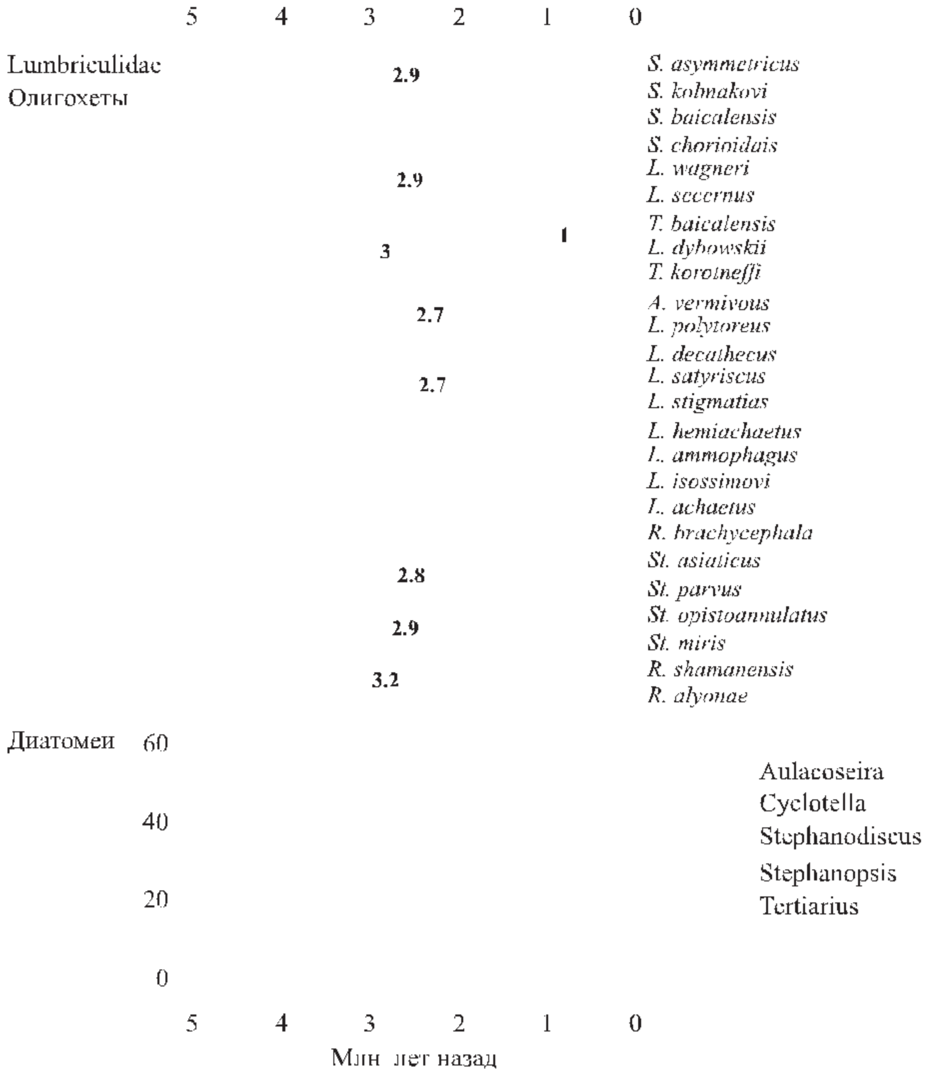
1 — скорость эволюции в среднем по белку, *2* — в центре контакта α_1–β_2, *3* — в регуляторном центре связывания дифосфоглицерата

Рисунок 20.2



Эволюционное древо жизни, выявленное в результате сравнения последовательностей 16S и 18S рРНК [Pace, 1997]

Рисунок 20.3



Сопоставление филогенетического древа олигохет озера Байкал, построенного по результатам определения частоты замен нуклеотидов в гене цитохромоксидазы, и представленности диатомовых водорослей разных таксонов.

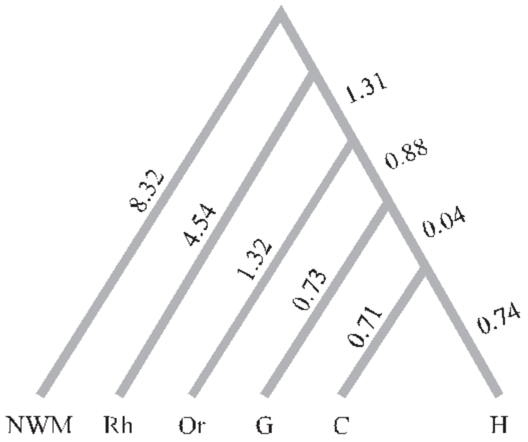
Рисунок любезно предоставлен М. А. Грачевым, Д. Ю. Щербаковым и И. А. Кайгородовой

2. Различные гены эволюционируют с разной скоростью (табл. 20.2). Например, скорость замен-несинонимов в гене пролактина у млекопитающих в 300 раз выше, чем в гене гистона H4.

3. По данным В. А. Ратнера и сотрудников, скорость эволюции молекулы глобина непостоянна во времени, она имела максимум примерно 400–500 млн лет назад, в эпоху выхода позвоночных животных из Мирового океана на сушу (рис. 20.1).

По ряду соображений изучать скорость замен нуклеотидов проще в митохондриальной ДНК. Главным образом это связано с тем, что мтДНК передается только по материнской линии без смешивания с мтДНК от других особей. Другими словами, можно изучать одну и ту же молекулу в разных поколениях. Скорость замен нуклеотидов в некодирующем участке мтДНК рассчитывается по дате, когда шимпанзе и человек отделились от общего предка — около 5 млн лет назад, т.е. происходит одна мутация на 300–600 поколений (6 000–12 000 лет). В некоторых случаях обнаруживают еще более высокие частоты: 1 мутация на 40 поколений (800 лет). По другим данным, одна мутация встречается в 1200 лет. Эти сведения заставляют пересмотреть представления, согласно которым «митохондриальная Ева» — женщина, чья мтДНК оказалась предшественником

Рисунок 20.4



Филогенетическое древо приматов, построенное в результате анализа некодирующих последовательностей, смежных с глобиновым псевдогеном [Goodman et al., 1983 — Из: Ратнер, 1999].

NWM — обезьяны Нового Света, Rh — макак резус, Or — орангутан, G — горилла, C — шимпанзе. Цифры у ребер означают число замен на 100 позиций нуклеотидов

мтДНК всех ныне живущих людей, жила примерно 100–200 тыс. лет назад в Африке. Используя «молекулярные часы», можно подсчитать новый возраст — ей бы исполнилось всего 6000 лет.

Исследования скорости мутационных замен позволяют выявлять степень родства между видами, родами и более крупными таксонами, а также строить эволюционные древа. Если раньше сходство между видами выявляли главным образом по фенотипам, то теперь эти поиски ведутся и по результатам анализа структуры гена. Использование метода частоты замен позволяет сравнивать эволюционную близость организмов, имеющих мало общих морфологических признаков или не имеющих их совсем, например бактерию и человека. На рис. 20.2 изображено эволюционное древо, охватывающее все крупнейшие таксоны и построенное по частоте дивергенции нуклеотидов в генах 16S и 18S рибосомных РНК.

На этом древе вершины всех трех глобальных ветвей примерно одинаково удалены друг от друга, поэтому вместо двух известных царств — эукариот и прокариот — с необходимостью пришлось выделить три: бактерии, археи и эукарии.

В некоторых случаях удается накладывать древа на хорошо идентифицируемые геологические или временные маркеры. Методом «молекулярных часов» было оценено время появления тех или иных видов различных таксонов в экосистеме озера Байкал. Затем сопоставили их с датами крупных геологических событий (рис. 20.3). У олигохет имели место два всплеска видообразования, один около 1,0–0,5 млн лет назад и другой около 3 млн лет назад, в то время, когда в экосистеме Байкала стали доминировать диатомеи рода *Cyclotella*.

Особым аспектом использования последовательностей ДНК является изучение эволюционных связей человека и его ближайших родичей в животном мире. Несмотря на большие различия в размерах и строении тела, строении лица, волос, цвете кожи, генетические различия между человеческими популяциями относительно невелики. По результатам анализа мтДНК средние различия между двумя популяциями составляют примерно 0,33 %. У других приматов различия существенно больше, например, у двух подвидов орангутана они составляют 5 %.

М. Гудман с соавторами построили филогенетические древа у приматов (рис. 20.4). Из этого сопоставления следует, что ближайшим филогенетическим родственником человека является шимпанзе. По существующим оценкам геномы человека и шимпанзе отличаются примерно по $3{,}2 \times 10^7$ нуклеотидов из $3{,}7 \times 10^9$, т. е. они различаются только по каждому сотому нуклеотиду, а остальные 99 у них одинаковы [Ратнер, 1999].

Литература

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 476–495.

Ратнер В. А. Молекулярная эволюция // Соросовский образовательный журн. 1998. № 3. С. 41–47.

Ратнер В. А. Молекулярная эволюция // Современное естествознание: Энциклопедия. Т. 2. Общая биология. М.: Наука-Флинта, 1999. С. 63–68.

Gibbons A. Calibrating the mitochondrial clock // Science. 1998. Vol. 279. P. 28–29.

Pace N. A molecular view of microbal diversity in the biosphere // Science. 1997. Vol. 276. P. 735.

Russell P. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc., 1998. P. 759–766.

Wallace R. A., Sanders G. P., Ferl R. J. Biology. New York: Harper Collins College Publishers, 1996. P. 363.

Глава 21
ГЕНЕТИКА ПОВЕДЕНИЯ

Хорошо известно, что гены всех живых организмов кодируют информацию о синтезе белковых молекул, из которых создаются все компоненты клеток и которые катализируют все биохимические процессы.

Фактически каждую биохимическую функцию или элемент морфологии тела у дрозофилы удалось связать с действием того или иного гена.

Другое дело — поведенческие и психические функции, такие как мотивация поступков, приверженность привычкам, расположенность к определенной сфере деятельности или психическим болезням, способность к обучению, половое поведение.

В последнее время больших успехов достигли исследователи, работающие в области генетики поведения дрозофилы.

21.1. ГЕНЕТИКА ПОВЕДЕНИЯ ДРОЗОФИЛЫ

У дрозофилы лучше всего изучены гены, контролирующие такие простые функции, как зрение, обоняние, брачное поведение, способность к обучению.

21.1.1. Гены зрительной системы

К настоящему времени у дрозофилы описано несколько генов, влияющих на зрение.

Ген *sevenless* (*sev*). Мутанты по гену не обнаруживают нормального фототаксиса на ультрафиолетовый свет.

Ген *optomotor-blind* (*omb*). Гомозиготы по мутациям этого гена не реагируют на вращающиеся вертикальные полосы, особенно во время ходьбы; в полете действие мутаций проявляется слабее. У мутантов отсутствует гигантский тяж нейронов в оптической доле визуальной системы головного мозга. У других двукрылых насекомых, более крупных, чем дрозофилы, эти тяжи необходимы для обнаружения передвигающихся предметов. Молекулярные размеры гена *omb* велики — около 100 тпн. С этого гена считывается около 20 видов различных молекул мРНК.

Ген *small-optic-lobes* (*sol*). У мутантных куколок дегенерирует около 50 % клеток в оптической доле головного мозга. В результате нарушается система ориентировки и правильность поведения во время посадки после полета. Ген *sol* клонирован, он располагается в участке ДНК размером 14 тпн. С него считывается два транскрипта длиной 5,8 и 5,2 тпн. Больший транскрипт кодирует белок, состоящий из 1597 аминокислот. Этот белок имеет способность связываться с ДНК, т. е. может блокировать активность других, регулируемых им генов.

21.1.2. Функция обоняния

Дрозофилы могут различать большое число различных запахов, как на личиночной, так и на имагинальной стадиях.

Эксперименты по хирургии показали, что запахи улавливаются особыми чувствительными органами, расположенными на антенне. В этом органе есть поры, куда могут проникать молекулы, несущие характерные запахи. От антенн идут нейроны к головному мозгу. Нейронов очень много, около 1000, поэтому неудивительно, что муха так легко различает многочисленные запахи.

Обнаружено шесть генов, контролирующих чувствительность к запахам альдегидов и эфиров: *olfA*, *olfB*, *olfC*, *olfD*, *olfE*, *sbl*.

21.1.3. Гены, контролирующие способность к обучению

Взрослые мухи дрозофилы обладают способностью связывать ощущения запахов с болевыми ощущениями от электрического тока, т. е. у них можно вызывать формирование условного рефлекса. К настоящему времени открыты как минимум 3 гена, влияющие на эффективность обучения. Это гены *dunce* (*dnc*) и *rutabaga* (*rut*).

Мутанты по гену *dunce* не способны обучаться, «тупицы». Ген этот имеет огромные размеры (см. рис. 7.71). Он функционирует в клетках определенной доли головного мозга (ганглия) мух — в грибовидном теле. Если у древесных муравьев хирургически разрушить это тело, у них нарушаются основы «социального» поведения. Эти данные свидетельствуют о роли грибовидного тела в осуществлении поведенческих реакций. Интересно, что у молодых мух в грибовидном теле быстро возрастает число новых нейронов, что связывают с накоплением опыта в процессе обучения.

Ген *rutabaga* кодирует белок кальций/кальмодулин-зависимую аденилатциклазу. Этот ген экспрессируется в головном мозге имаго и вовлечен в процессы запоминания и памяти. Некоторые мутации влияют на развитие грибовидного тела мозга, мутанты обнаруживают трудности в обучении. Последовательности нуклеотидов, гомологичные *rutabaga*, были найдены в геномах *C. elegans*, мыши, коровы и человека. Таким образом, по крайней мере некоторые этапы обучения у насекомых и млекопитающих имеют общие черты.

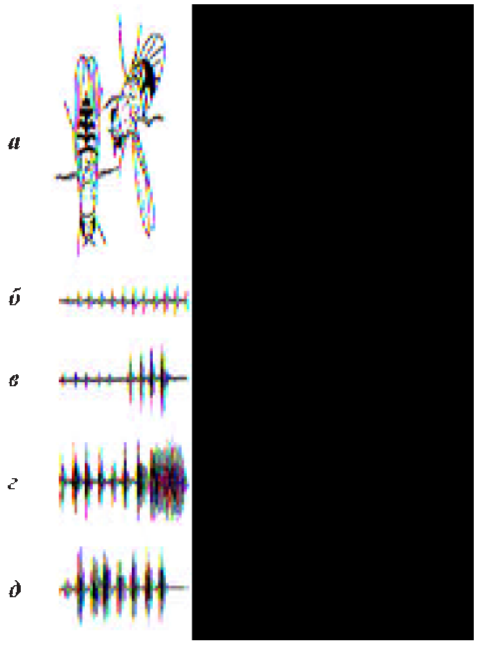
Ген *agnostic* кодирует кальмодулин — ингибирующий белок. Мутанты по гену полностью утрачивают способность к обучению.

21.1.4. Брачное поведение

После проведения первых исследований в 1956 г. к настоящему времени брачное поведение мух описано во всех деталях. И самцу, и самке присущи довольно сложные движения — брачные танцы. Во время них инициатива принадлежит самцу, он трогает брюшко самки, бегает вокруг нее, преследует, касается хоботком ее гениталий, делает попытки копуляции, притягивая ее брюшко к себе лапками. При этом он исполняет «песню любви». Эта песня представляет собой вибрацию крыльев продолжительностью в 55 с, состоящую из импульсов в 20–30 мс с межимпульсовым промежутком в 30–40 мс, с частотой 160 Гц (рис. 21.1, *б*).

Очевидно, что весь процесс ухаживания довольно сложен, и любые мутации, влияющие на остроту зрения, обоняния, слуха, на способность выдерживать генетически закрепленную периодичность «песни любви», приводят к нарушению процесса ухаживания и его эффективности, заключающейся в скрещивании. Так, слепой самец не может увидеть самку, в свою очередь «глухая» самка не может услышать «песню любви», исполняемую самцом. Особи обоих полов, не различающие запахи, все-таки

Рисунок 21.1



Положение самца и самки во время ухаживания (*а*) и акустическая картина песни у особей дикого типа (*б*), у мутантов *dissonance* (*в*, *г*) и *cacophony* (*д*) [Kyriacou, Hall, 1994. P. 153]

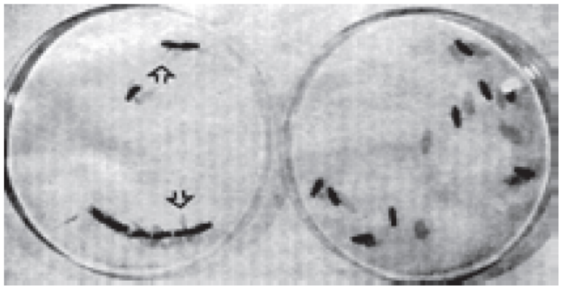
могут вступить в копуляцию, но у них на это уходит больше времени. Эти нарушения полового поведения ожидаемы. Однако есть и более тонкие механизмы. Известны мутации по крайней мере трех типов, влияющие на исполнение «песни любви». В результате мутации *cacophony* резко увеличивается амплитуда колебаний во время импульса, мутация *dissonans* изменяет песню таким образом, что вместо правильного чередования импульсов и межимпульсовых промежутков наблюдается один мощный продолжительный импульс (см. рис. 21.1, *в–д*).

У мутантов по гену *slowpoke* нормальная вначале песня заканчивается полициклическим импульсом с большой амплитудой, напоминающим импульс, характерный для мутанта *dissonance*.

Мутации гена *clock* (часы) изменяют продолжительность одного цикла «песни любви». При общей продолжительности одного цикла песни в 55 с некоторые мутации уменьшают ее до 40 с, другие увеличивают до 80 с. Изменение акустической структуры «песни любви» резко изменяет и эффективность ухаживания самца за самкой.

Известны мутации, влияющие и на весь процесс ухаживания и последующего спаривания. Мутанты по генам *hni (he is not interested)* и *courtless* не обнаруживают признаков ухажи-

Рисунок 21.2



«Цепи» ухаживающих друг за другом самцов (указаны стрелками в чашке Петри слева), мутантных по гену *fru*, и самцы, нормальные по этому гену (справа) [Kyriacou, Hall, 1994. P. 156]

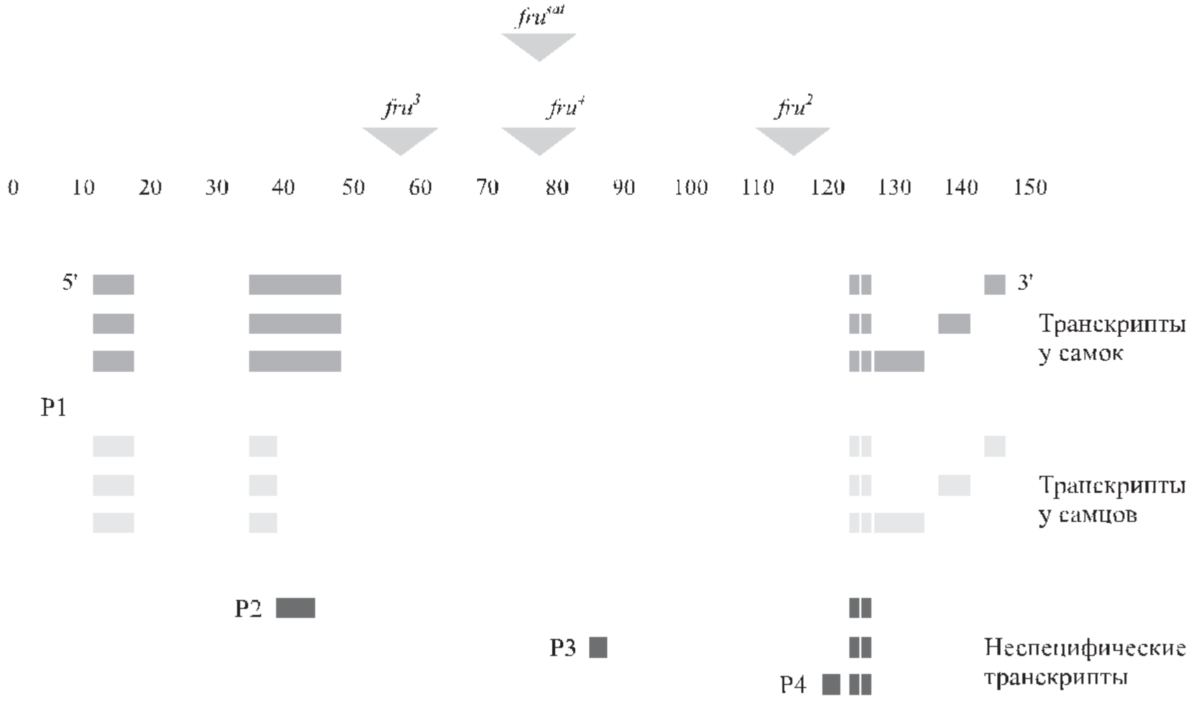
вания *(hni)* или процесс ухаживания сильно изменен (*courtless*). Мутанты *plt (platonic)* демонстрируют нормальные этапы ухаживания и исполняют нормальную «песню любви», но не копулируют.

Мутации гена *fru — fruitless* (бесплодный) полностью изменяют половое поведение самцов — возникает сразу три нарушения: 1) они не делают попыток ухаживать за самками, 2) ухаживают только за самцами — такими же гомозиготами по этой мутации и за дикими самцами, 3) стимулируют нормальных самцов ухаживать за собой (рис. 21.2).

Естественно, самцы *fru* потомства не оставляют, это мухи-гомосексуалисты. Мутанты *fru* выделяют специфическое вещество с соответствующим запахом, привлекающим других самцов. Экстракты из самцов *fru* стимулируют ухаживание самцов за самцами. Это предполагает, что летучий компонент из самцов *fru* является «sex-appeal» для других самцов. Ген *fru* активен в небольшой антеннальной доле головного мозга, которая получает информацию о запахах (грибовидное тело). Первые данные свидетельствуют о наличии небольшой доли мозга, оценивающей информацию о запахах, в которой происходит выбор, по какому пути пойдет половое поведение: по типу самца или самки. И этот выбор контролируется геном *fru*. Ген *fru* занимает 140 тпн, с него считывается около 15 транскриптов за счет использования четырех промоторов Р1–Р4 (рис. 21.3). Фенотип *fru* формируется за счет нарушения тех транскриптов, которые считываются с промотора Р1 в некоторых участках центральной нервной системы.

Мутанты по гену *sluggish* не скрещиваются с самками в темноте, на свету самцы ухаживают либо за самками, либо за другими самцами с одинаковой энергией.

Рисунок 21.3



Физическая карта гена *fruitless* [Goodwin et al., 2000].
Инсерции *P*-элементов, приводящие к мутациям fru^3, fru^4, fru^{sat}, fru^2, указаны треугольниками

Ген *Les (Lesbian)*. Мутантные самки ухаживают за другими самками, демонстрируя поведение, характерное для самцов, в частности, изменение положения крыльев (см. рис. 21.1, *а*).

Ген *Voila* (*à la voile et à la vapeur* — с французского слэнга — бисексуальное поведение). Мутантные самцы обнаруживают бисексуальное поведение, т. е. ухаживают за виргинными самками и зрелыми самцами.

21.1.5. Гены, влияющие на биоритмы

Циркадные ритмы (от лат. circa-dies — круглосуточный) контролируют развитие большинства биологических систем и варьируют от суточных колебаний фотосинтеза у растений до контролируемой секреции гормонов и годовой цикличности размножения млекопитающих. Циркадные ритмы описаны почти у всех эукариот, включая высшие растения, грибы, насекомых и млекопитающих.

Первый ген, контролирующий периодичность физиологических процессов, был описан у дрозофилы — *period (per)* в 1971 г. Р. Конопкой и С. Бензером.

Биоритмика у мух обнаружена при откладке яиц, вылуплении эмбрионов и появлении имаго из куколок. Биоритмична также брачная «песня» у самцов. Выделены три группы мутаций: per^{S} — укорачивают биоцикл с 24 ч до 19 ч, мутации группы per^{L} — удлиняют цикл до 29 ч и per^{01} — полностью нарушают ритмику биологических процессов. Установлено, что этот ген функционирует в клетках головного мозга, он кодирует белок, содержащий около 1200 аминокислот. У мутанта per^{01} обнаружен стоп-кодон после 460 аминокислот, в результате чего синтезируется усеченный нефункциональный белок и биоритмика полностью нарушается. В середине нормальной белковой молекулы находится 20-кратный повтор пары аминокислот треонин–глицин. Именно этот повтор влияет на продолжительность «песни любви». Если этот повтор экспериментально удалить, «песня» укорачивается с 55 с до 40 с.

Белок и мРНК гена *per* находят во многих органах и тканях, включая нервную систему, желудок, мальпигиевы сосуды, репродуктивную систему, кольцевую железу и слюнные железы. В нервных клетках у взрослых мух белок PER находят в фоторецепторах глаз, в оптических долях, центральном мозговом комплексе, торакальном ганглии, а также в глиальных клетках центральной нервной системы.

В пределах клеток белок PER находят преимущественно в ядрах. Анализ аминокислотных последовательностей этого белка показал сходство их с доменами в ДНК-связывающихся белках по типу спираль–петля–спираль.

Белок PER образует комплекс с другим белком циркадного ритма – продуктом гена *timeless (tim).* Полагают, что этот комплекс регулирует экспрессию кодирующих их генов посредством системы обратной связи: синтезируется белок PER, затем он фосфорилируется, и отсутствие нормального белка PER индуцирует транскрипцию гена *per*. Синтез как РНК, так и белка осуществляется с 24-часовой цикличностью. В 1998 г. открыт еще один ген, влияющий на циркадные ритмы — *double-time (dbt)*. Он, по-видимому, контролирует степень стабильности белков типа PER.

Гены, контролирующие циркадные ритмы, выделены у ряда других организмов: гены *frequency* и *white collar 2* у *Neurospora crassa*, два гена у млекопитающих.

Во всех изученных случаях часовой механизм включает молекулярную систему обратной связи.

Литература к разделу 21.1

Жимулёв И. Ф. Генетическая детерминированность поведения дрозофилы и человека // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 22–25.

Barinaga M. Bisexual fruit flies point to brain courtship centers // Science. 1995. Vol. 267. P. 791–792.

Goodwin S. F. et al. Aberrant splicing and altered spatial expression patterns in fruitless mutant of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2000. Vol. 154. P. 725–745.

Hall J. C. The mating of a fly // Science. 1994. Vol. 264. P. 1702–1714.

Hall J. C. Pleiotropy of behavioral genes // Flexibility and constraint in behavioral systems / R. J. Greenspan, C. P. Kyriacou (eds). John Wiley and Sons Ltd., 1994. P. 15–27.

Hall J. C., Kyriacou C. P. Genetics of biological rhythms in *Drosophila* // Adv. Insect Physiol. 1990. Vol. 22. P. 221–298.

Kloss B., Price J. L., Saez L. et al. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase I_{E} // Cell. 1998. Vol. 94. P. 97–107.

Kyriacou C. P., Hall J. C. Genetic and molecular analysis of *Drosophila* behavior // Adv. Genet. 1994. Vol. 31. P. 139–186.

Peixoto A. A., Hall J. C. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila* // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 827–838.

Peresleni A. I., Savvateeva E. V., Peresleni I. V., Sharagina L. M. Mutational analysis and genetic cloning of the *agnostic* locus, which regulates learning ability in *Drosophila* // Neurosci. Behav. Physiol. 1997. Vol. 27. P. 258–263.

Sassone-Corsi P. Same clock, different work // Nature. 1996. Vol. 384. P. 613–614.

21.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ПОВЕДЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Поиски связей между различными аспектами поведения млекопитающих и человека и конкретными генами или хромосомами ведутся весьма интенсивно. Однако исследователи генетического контроля поведения сталкиваются с рядом трудностей:

1. Прежде всего, не совсем понятно, какие признаки считать собственно «поведенческими», а какие — физиологическими? Например, мутация, делающая животное слепым, изменит и его поведение, однако вряд ли можно считать, что нормальный аллель этой мутации контролирует поведение.

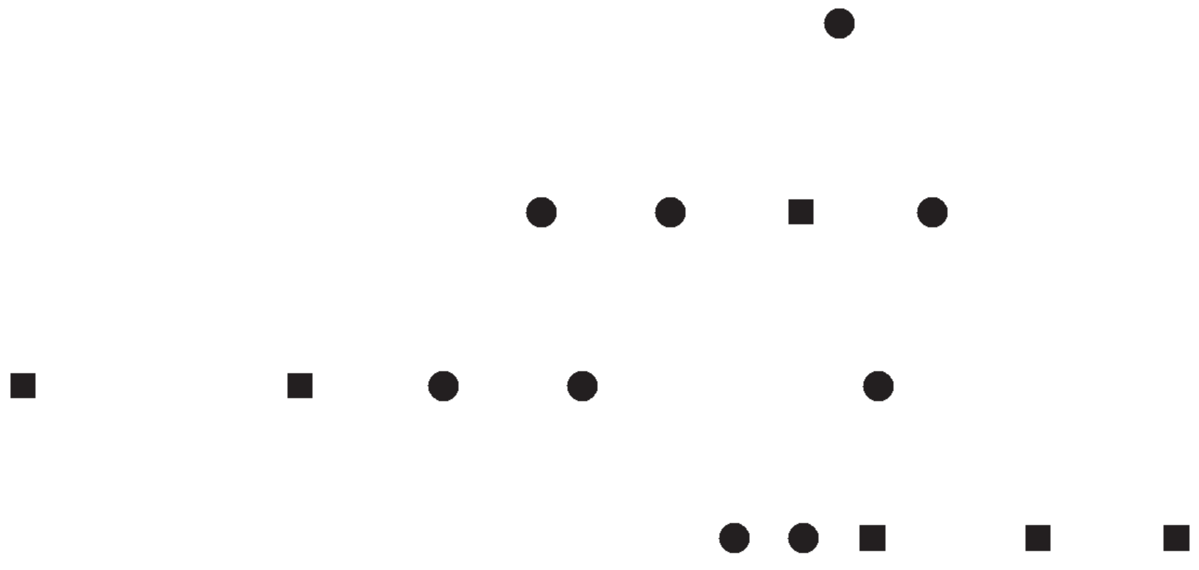
2. Даже у самых простейших организмов большинство поведенческих признаков контролируется многими генами.

3. В ряде случаев мутантные аллели вызывают серьезные нарушения нервной системы и, как следствие, изменения поведения, однако вряд ли и эти мутации можно считать поведенческими. Примером таких нарушений может быть потеря памяти, связанная с гибелью нервных клеток в районах мозга, контролирующих обучение и память.

До сих пор поиски связи между определенными проявлениями поведения и единичными генами или участками хромосом заканчивались, как правило, неудачами. В 1965 г. группа исследователей предположила, что есть корреляция между присутствием в геноме человека добавочной *Y*-хромосомы (т. е. генотип *XYY*) и повышенной агрессивностью. Версия существовала до 1993 г., пока Национальная академия наук США не объявила ее не доказанной. Аналогичные гипотезы продолжали возникать в 1980-х гг.: о связи генов хромосомы 5 с возникновением шизофрении, хромосомы 11 с психозами и депрессией, мутации D_z-дофаминрецепторного гена и алкоголизма и т. д. Все они оказались неподтвержденными [Science. 1994. Vol. 264. P. 1687].

Все же некоторые примеры генетического контроля поведенческих реакций у млекопитающих были обнаружены. Выявлены межлинейные различия в агрессивности самцов мышей при содержании их в группах по 2–8 особей и исследованы интенсивность (число драк и их суммарная продолжительность), а также уровень спонтанной агрессии (доля агрессивных животных в линии) у мышей семи инбредных линий. При скрещивании мышей высокоагрессивной линии с низкоагрессивными животными было установлено наследование высокого уровня агрессивности у гибридов первого поколения. У гибридов второго поколения и в потомстве от возвратного скрещивания с низкоагрессивным родителем отмечена меньшая доля агрессивных животных, чем у гибридов первого поколения. Известно, что агрессивное поведение в популяции мы-

Рисунок 21.4



Родословная семьи, в которой выявлена мутация, нарушающая суффиксацию речи и наследуемая в трех поколениях по аутосомно-доминантному типу [Fisher et al., 1998].

Символы больных затемнены

шей играет существенную роль в установлении иерархической структуры. При анализе вышеупомянутых линий было показано, что у мышей агрессивной линии иерархические отношения формируются, в то время как у животных неагрессивной линии — нет.

Повышенная агрессивность связана с мутацией в гене, кодирующем один из рецепторов серотонина.

В другом исследовании анализировали четыре линии крыс, различающихся по пристрастию к алкоголю: крысы двух линий предпочитали 10 %-й алкоголь обычной воде, а крысы из двух других линий избегали его. Крысы-пьяницы имели более низкий уровень серотонина и дофамина.

У человека многие жизненно важные процессы имеют циркадную ритмику: физическая и умственная активность, сердечный пульс, пищеварение, выделение адреналина. Ритм выделения мелатонина, ростового и половых гормонов зависит от продолжительности светового дня и сохраняется у людей, живущих в условиях эксперимента в подземных пещерах без доступа света и сведений о времени суток. За чувство биологического ритма отвечают две группы клеток в основании гипоталамуса (супрахиазматические ядра). Генетические и молекулярные исследования показали, что чувство времени контролируется группой генов, мутации по которым приводят к существенным изменениям длины циркадного периода [Waterhouse, 2001].

Недавно у человека был открыт ген, мутанты по которому страдают серьезными нарушениями речи, выражающимися в неиспользовании грамматической суффиксации. Прослежена родословная передачи этого дефекта в трех поколениях (рис. 21.4).

Два момента заслуживают внимания в этом случае. «Во-первых, нарушения речи и языка не связаны с нарушениями интеллекта, что не подтверждает марксистского постулата о неразделимости языка и мышления. Во-вторых, мутация действует на определенную грамматическую функцию» [Колпаков, 1998].

Литература к разделу 21.2

Колпаков В. Г. Комментарий к статье Саймонса Фишера и др. «Локализация гена, ответственного за нарушение речи и языка», опубликованной в «Nature Genetics», февраль 1998, vol. 18, № 2 // Вестн. ВОГиС. 1998. № 2. С. 12–13.

Корочкин Л. И. Гены и поведение // Соросовский образовательный журн. 1997. № 1. С. 15–21.

Корочкин Л. И., Михайлов А. Т. Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000. 274 с.

Barinaga M. From fruit flies, rats, mice: evidence of genetic influence // Science. 1993. Vol. 264. P. 1690–1693.

Fisher S., Vargha-Khadem F., Watkins K. E. et al. Localisation of a gene implicated in severe speech and language disorder // Nature Genetics. 1998. Vol. 18. P. 168–170.

Waterhouse J. Time in biology with particular reference to humans // European Review. 2001. Vol. 9. P. 31–42.

Глава 22
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЧЕЛОВЕКА

Наиболее сложной и недоступной для генетического анализа является сфера психологии человека: поведенческие и личностные характеристики, психические функции, такие как мотивация поступков, приверженность привычкам, расположенность к определенной сфере деятельности или психическим болезням, способность к обучению, ум, внимание, темперамент, фантазия, память и т. д.

22.1. ПОНЯТИЕ О ЕВГЕНИКЕ

Люди и задолго до возникновения генетики интересовались вопросами наследования черт характера, психических особенностей, различных талантов и возможностями их изменения. В результате возникло такое направление, как евгеника. Евгеника в переводе с греческого — рождение лучших. Это скандальное направление человеческой мысли ищет пути улучшения наследственных качеств человека, используя генетические принципы. Ей всегда было трудно оставаться чистой наукой: политики использовали ее плоды по-своему.

Первым, кто решил скорректировать природу человека, был Платон (428–347 гг. до н. э.). В своем труде «Политик» он пропагандировал государственное регулирование браков, объясняя, как следует подбирать супругов, способных рождать детей с выдающимися физическими и нравственными характеристиками.

В древней Спарте селекцию людей проводили более кардинально, уничтожая младенцев, не обладающих физическими качествами, необходимыми для будущего воина.

Отцом евгеники, так же как и автором ее названия, стал Ф. Голтон. В 1869 г. он, проанализировав родословные талантливых людей, пришел к двум выводам: 1) гениальные способности наследуются; 2) каждый человек несет в себе груз наследственных признаков, что выражается в характере, интеллекте, болезнях. Условия жизни и обучение уже просто наслаиваются на наследственность.

Основатели евгеники почему-то предпочтение отдали генофонду англо-саксов. Они изучили немало родословных отдельных семей, находившихся на различных уровнях социальной иерархии, и обнаружили поразительные факты, свидетельствующие о генетической обусловленности социальной деятельности. Например, среди 1394 мужчин из семьи Эдвардсов в США не менее четверти лиц внесли заметный вклад в общественную жизнь и вошли в историю. Среди них талантливые ученые, писатели, политики, юристы, священнослужители, врачи, высшие офицеры.

Исследователям-историкам известно, что в роду И. С. Баха было 56 музыкально одаренных родственников.

В российской истории тоже можно найти похожие примеры. В книге А. П. Акифьева «Генетика и судьбы» читаем: «...Ю. А. Филипченко опубликовал родословную трех поколений старинного дворянского рода Ляпуновых. В этой семье мы видим известного астронома Михаила Васильевича Ляпунова и его трех сыновей — Александра Михайловича — математика-академика, Бориса Михайловича — академика-лингвиста, Сергея Михайловича — известного композитора. Через одну сестру Михаила Васильевича эта семья состояла в свойстве со знаменитым физиологом И. М. Сеченовым, а через другую его сестру — с семьей Зайцевых, давшей на протяжении двух поколений трех физиков и одного математика. Через племянницу Михаила Ляпунова все эти лица находились в свойстве с семьей Крыловых, сыном этой племянницы был гордость русской науки академик А. Н. Крылов. Сергей Ляпунов был женат на внучке В. И. Даля, среди его детей также были ярко одаренные ученые и музыканты. Потомки Ляпуновых и сейчас заметные люди в российской интеллигенции».

Тогда же Ф. Голтон и пришел к общему выводу о том, что шансы сына знаменитого отца стать известным человеком в пятьсот раз превышают шансы случайного человека.

Один из классических примеров противоположного свойства, известный всем студентам-медикам и биологам двадцатых годов — семейство Джюков, возникшее в XVIII в. в Северной Америке от брака пьяницы-рыбака и беспутной женщины. Из 2500 потомков Джюка около шестисот человек оказались слабоумными, а 55 % — ворами, мошенниками, пьяницами, бродягами и проститутками. К концу XIX в. ущерб, нанесенный этим семейством государству (США), оценен в 1,2 млн долларов — сумма по тем временам огромная.

Аналогичный пример опубликовал несколько лет назад немецкий ученый Пельман. Это родословная бродяги, воровки и пьяницы Ады Юрке, родившейся в 1740 г. Прослежены основные вехи жизни около 700 ее потомков, из них 142 были нищими, 181 — проститутками, 76 — разного рода преступниками. Интересно, что нередко детей из такого рода неблагополучных семей брали на воспитание в нормальные здоровые семьи. Иногда результаты были благотворными. Однако чаще попытки правильного воспитания кончались неудачей: дети либо убегали, либо становились на путь своих биологических родителей.

Получив в руки эту козырную карту, политики разных стран решили побить одним махом все проблемы, связанные с умственно отсталыми, психически больными, алкоголиками, преступниками. Под лозунгом «улучшения человеческого вида» они стали бороться с носителями «мусорных» генов. В первом десятилетии XX в. в 29 штатах Америки, в Англии, Скандинавских странах, Эстонии были введены евгенические законы, позволяющие насильственно стерилизовать людей за наличие у них преступных наклонностей.

Дальше всех пошла Германия, окрестившая евгенику «расовой гигиеной». И представители «превосходной нордической расы» стали уничтожать новорожденных с пороками развития, умственно отсталых и евреев, как «носителей чужеродного генотипа».

Великий генетик Г. Мёллер прилагал значительные усилия для изменения преподавания биологии в средней школе и разработки евгенической программы, названной «Выбор зачатия», согласно которой сперма выдающихся мужчин должна быть заморожена для дальнейшего использования при зачатии здорового и умного будущего поколения. Он изложил свои взгляды по этим вопросам в книге «Выход из ночи: взгляд биолога на будущее» («Out of the night: a biologist’s view of the future», 1935) [Лауреаты..., 1992].

В России сторонниками евгеники были крупнейшие биологи и генетики Н. К. Кольцов, А. Ф. Филипченко, А. С. Серебровский.

Ю. А. Филипченко создал специальную анкету, которая распространялась среди петроградской ителлигенции. Эти работы по распространению и анализу анкет были начаты в 1921 г. по предложению Н. К. Кольцова — главы московской генетической школы. Базой исследования служило Бюро по евгенике при Комиссии по естественным производительным силам России (КЕПС), организованное Ю. А. Филипченко в 1921 г. одновременно с Ленинградским отделением Русского евгенического общества.

Материалы 605 анкет, собранных Ю. А. Филипченко, послужили основой для ряда статей по наследственности человека, из которых особо следует отметить работу «Интеллигенция и таланты», опубликованную в 1925 г. в журнале «Известия Бюро по евгенике» — издании, также основанном этим выдающимся ученым. В упомянутой статье Ю. А. Филипченко рискнул дать определение интеллигенции, хотя и осознавал, что определение это далеко не совершенное. «Под интеллигенцией мы понимаем представителей тех профессий, занятие которых связано с большой умственной работой и требует, с одной стороны, долгой выучки, с другой — наличия известных способностей». В этой же статье он отмечает, что гены, от благоприятного сочетания которых зависит проявление талантов, распространены среди всех слоев общества. В то же время наибольшая их концентрация обнаруживается в среде интеллигенции. Именно по этой причине ближайшие предки высокоодаренных людей чаще всего относятся к среде интеллигенции. В своих евгенических взглядах Ю. А. Филипченко последовательно развивал воззрения основоположника этой науки — Ф. Голтона, а некоторые выводы, сделанные Ю. А. Филипченко, актуальны и сегодня [Инге-Вечтомов, 1994].

С А. С. Серебровским связывают мечтания о создании породы людей, которые могли бы выполнять пятилетки за 2 года за счет обеспечения женщин спермой вождей революции. Основанием для этого стала следующая неосторожная фраза Серебровского: «...если бы нам удалось очистить население нашего Союза от различного рода наследственных страданий, то, наверное, пятилетку можно было бы выполнить в 2 (?) года» [Цит по: Бабков, 1998]. Советским женщинам в этом смысле повезло:

в 30-х гг. генетика человека в нашей стране была официально провозглашена нацистской наукой, и все исследования в этой области были закрыты. Разумеется, никто более не прислушивался к рекомендациям евгеников.

Сегодня евгеника направлена на искоренение в человеческом роде наследственных заболеваний. Известно, что лечение и профилактика заболеваний сохраняют вредные гены, которые раньше исчезали со смертью больного. По словам Н. П. Дубинина, медицина, выхаживающая ростки жизни, подтачивает этим общую наследственность человека, т. е. забота о здоровье отдельной личности вступает в конфликт с заботой о здоровье рода.

Рассмотрение евгеники можно свести к обсуждению трех главных вопросов: 1) имеются ли у человека нежелательные наследственные признаки, и если имеются, то усиливаются ли они в последовательных поколениях; 2) возможно ли имеющимися в нашем распоряжении методами существенно понизить частоту этих признаков; 3) если возможно повлиять на генетический состав будущих поколений, то имеем ли мы моральное и юридическое право сделать это?

В настоящее время известно, что имеются сотни ненормальностей и дефектов в каждой системе органов человеческого тела, которые обусловлены целиком или главным образом действием генов. Никто не станет отрицать нежелательность таких признаков, как слабоумие, психические болезни, эпилепсия, или таких ужасных физических ненормальностей, как ахейроподия, при которой руки и ноги представляют собой короткие культи. Вероятно, наиболее серьезной проблемой является слабоумие: число слабоумных среди населения составляет примерно 2 %. Наблюдения свидетельствуют о том, что пара слабоумных родителей почти неизменно производит на свет только слабоумных детей.

Если не может быть двух мнений относительно нежелательности слабоумия, то ответить на вопрос о том, какие именно признаки желательны, не так уж и легко. Совершенно очевидно, что, прежде чем проводить в жизнь какую-либо положительную евгеническую программу, необходимо прийти к какому-то общему мнению относительно желательных особенностей. Обществу, состоящему из одних гениев, вероятно, нелегко было бы существовать. Приспособляемость, эмоциональная устойчивость, здоровье и другие качества, скорее всего, так же желательны, как и умственная одаренность. Современное общество чрезвычайно сложно и требует выполнения разнообразнейших обязанностей, а следовательно, и нуждается в людях с разнообразнейшими темпераментами, умственными способностями, талантами и силами.

По мнению А. П. Акифьева, «более важно другое возражение-вопрос: кто будет проводить в жизнь мероприятия по коррекции генофонда? Очевидно, что такой заказ не может быть ни классовым, ни профессиональным, он должен быть только общечеловеческим. Его может дать только то общество, для которого мерой ценностей будет отношение не к массе и не к избранной по идеологическим соображениям группе людей, а к каждому индивидууму. ... Только в этом случае мечты о новом человеке не обернутся предстоящей трагедией мечтателей. Будет ли такое общество когда-нибудь на Земле?» [Акифьев, 1993. С. 66–67].

Литература к разделу 22.1

Акифьев А. П. Хомо советикус — хомо сапиенс? // Знание — сила. 1991. № 7. С. 12–19.

Акифьев А. П. Евгеника: вечный монстр или надежда человечества? // Знание — сила. 1992. № 5–7. С. 26–32, 40–41.

Акифьев А. П. Гены. Человек. Общество. М.: Прасковья, 1993. 67 с.

Бабков В. В. Август 1948 и судьбы медицинской генетики // Вестн. ВОГиС. 1998. № 6. С. 6–11.

Горощенко Ю. Л. Юрий Александрович Филипченко — основатель отечественной генетической школы // Исследования по генетике. № 11. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1994. С. 12–22.

Инге-Вечтомов С. Г. Кафедра генетики и селекции Петербургского университета – первая кафедра генетики в России // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1012–1021.

Конашев М. Б. Бюро по евгенике (1922–1930) // Исследования по генетике. № 11. СПб.: Изд-во СПб ун-та, 1994. С. 22–28.

Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия. Т. 2. М.: Прогресс, 1992. С. 55.

Bouchard T. J., Jr. Genes, environment and personality // Science. 1994. Vol. 264. P. 1700–1701.

22.2. ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧЕЛОВЕКА

Исследование личностных особенностей человека можно разбить на три составляющие. Прежде всего из многообразия психических проявлений нужно выделить элементарные признаки, как это в свое время сделал Мендель на горохе. Для этого используются различные классификации психических характеристик. Затем производится объективная и точная регистрация признаков, выделенных классификацией, для чего применяют различные психометрические методы. И наконец изучают, как те или иные характеристики наследуются.

Рассмотрим некоторые психологические характеристики и их классификации.

Темперамент. Под темпераментом обычно понимается характеристика динамических свойств психики индивидуума: интенсивность и длительность различных психических состояний и процессов. По сей день используется четырехчленная схема темпераментов, введенная еще Гиппократом: холерики, флегматики, меланхолики, сангвиники.

Новое понимание гиппократовская схема получила в 1947 г. в исследованиях Х. Айзенка, предложившего рассматривать типологию темпераментов на основе двух ортогональных векторов (независимых переменных): эмоциональности, т. е. экстраверсии/интроверсии, и нейротизма, т. е. неустойчивости/устойчивости (рис. 22.1).

Полагая, что четырех социально значимых типов явно недостаточно, Х. Айзенк предлагает рассматривать дополнительно 32 переходных личностных типа, которые строятся из различных сочетаний тех же ортогональных векторов – экстраверсии и нейротизма.

Рисунок 22.1

Круг Айзенка [Чепкасов, 1992. С. 14].
Внутренние квадранты — типы темпераментов; внешнее кольцо — типы личности.
Названия ортогональных векторов выделены прописными буквами

Таблица 22.1. Основные характеристики личности [Bouchard, 1994. P. 1700]

Характеристика	Противоположные проявления	
Экстраверсия	Открытый в общении, решительный, убедительный, любит роль лидера	Скромный, застенчивый, скрытный, ушедший в себя, не любящий быть в центре внимания
Нейротизм	Эмоционально нестабильный, нервный, раздражительный, склонный к беспокойству	Быстро преодолевающий расстройства, стабильный, не склонный к беспокойствам и страхам
Добросовестность	Строящий планы, хорошо организованный, ответственный, практичный, надежный	Импульсивный, неосторожный, безответственный, ненадежный
Приятность	Симпатичен, любит теплые отношения, добрый, добродушный	Скандален, недружелюбен, агрессивен, холоден, мстителен
«Открытый ум»	Проницателен, любопытен, оригинален, одарен воображением, открытый для приобретения нового опыта	Имеет узкие интересы, неинтеллигентный, неразмышляющий, поверхностный

Личность. Существует множество определений понятия «личность». По современным представлениям для описания личности необходимо иметь сведения о пяти «сверхпризнаках» (табл. 22.1).

Личностные характеристики, как показывают исследования, сильно зависят от генотипа. Пара девушек — монозиготных близнецов, которые были разделены через неделю после рождения и почти не видели друг друга до 18 лет, были настолько похожи, что даже психологи, работавшие с ними, часто их путали (см. разд. 4.7).

Три группы исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют о генетическом контроле свойств личности. Во-первых, это крупномасштабные (свыше 2000 пар) исследования близнецов. Во-вторых, это сопоставление личностных свойств моно- и дизиготных близнецов, живущих как вместе, так и раздельно, с личностными свойствами биологических и приемных родителей. В-третьих, были разработаны модели и математический аппарат, позволяющие обрабатывать и использовать всю доступную информацию.

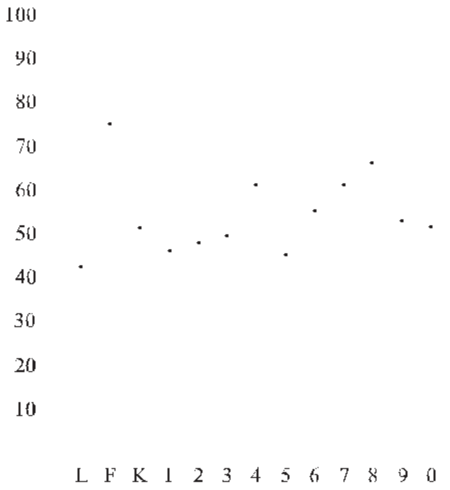
Результаты исследований близнецов, живущих раздельно, показали, что чисто генетическое влияние на формирование всех пяти личностных характеристик у белого населения США и Великобритании составляет около 70 % [Bouchard, 1994].

Характеристика личности с помощью многофакторных классификаций. Опросники представляют собой один из наиболее развитых и широко распространенных методов регистрации личностных характеристик. Опросник обычно состоит из списка вопросов и бланка ответов, в котором тестируемый выбирает один из вариантов ответа. Та или иная личностная характеристика представлена соответствующей шкалой опросника. Для каждой шкалы имеется информация о том, какие вопросы «работают» на нее и какова ценность того или иного ответа на эти вопросы. Чем выше значение шкалы (число набранных баллов — положительных ответов), тем сильнее развита у опрашиваемого данная личностная характеристика. Наиболее широко распространенным в мире опросником является MMPI (Minnesota Multidimensional Personality Inventory), который разработали в 1941 г. С. Хатавэй (S. Hathaway) и Дж. МакКинли (J. McKinley). Вопросы были выбраны на основании анализа высказываний большого числа психически больных. Эти больные проявляли типичные черты, свойственные для тех или иных психических заболеваний: депрессивные тенденции, гипоманиакальные, фобии, обсессии, бред, галлюцинации, садистские и мазохистские наклонности, желание выглядеть в глазах исследователя в возможно более благоприятном свете и т. д.

Оказалось, что тому или иному психическому заболеванию соответствует тот или иной набор (до 70) утверждений опрашиваемых. Эти наборы утверждений были объединены в 10 основных шкал, названных соответственно группе больных, по которым данная шкала была определена. Поскольку первоначально шкалы были разработаны для психопатологических синдромов, они сохранили клинические названия. Для шкалы 1Hs это была группа больных с ипохондрическим синдромом, 2D — с реактивной депрессией, 3Hy — конверсионными (неустойчивыми) реакциями (истерия), 4Pd — деликвентным поведением, 5Mf — трансвестизмом, 6Pa — параноидным синдромом, 7Pt – психастенией, 8Sc — шизофренией, 9Ma — синдромом гиперактивности и Osi —

Дополнение 22.1

Профили психологических шкал четырех жителей новосибирского Академгородка (составлены В. Ф. Чугуй, В. Г. Колпаковым и О. Э. Костериным).



Женщина 45 лет

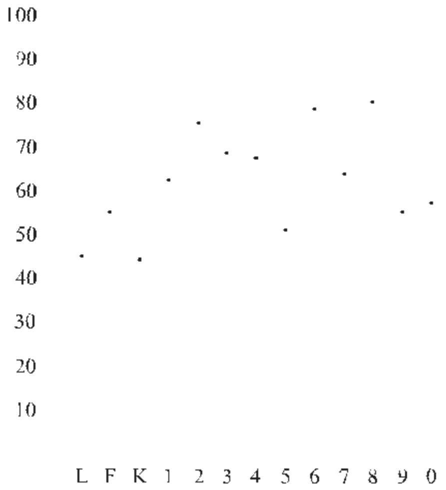
Высокие шкалы: индивидуалистичности (8), импульсивности (4), тревожности (7) и шкала F, в данном случае (на момент обследования), возможно, отражающая высокий уровень эмоциональной напряженности.

Профиль показывает аналитический склад мышления, оригинальность суждений, интересов. Отмечаются избирательность контактов, субъективизм в оценках, независимость, активная личностная позиция, высокая поисковая активность, преобладание мотивации достижения. Возможна высокая нетерпеливость, склонность к риску, независимость и самостоятельность. В личностно значимых ситуациях может проявляться конфликтность (4, 8).

Возможна амбивалентность в отношениях с людьми, которая связана с ожиданием внимания со стороны окружающих и боязнью холодности с их стороны. Амбивалентное отношение к окружающим наряду со стремлением к контактам может порождать недоверчивость, затруднения социализации, связанные с недостаточной способностью воспринимать правила и нормы окружения (8, 4).

Профиль также выявляет внутреннюю напряженность, тревожность, нервозность, склонность к бесконечному обдумыванию каких-либо проблем (умственная «жвачка»), отгороженность, хроническое чувство душевного дискомфорта (8, 7).

Имеет место проблема внутренне противоречивого, смешанного типа реагирования, в котором сталкиваются разнонаправленные тенденции: мотивации достижения с мотивацией избегания неуспеха, склонность к активности и решительным действиям со склонностью к блокировке активности в ситуации стресса, повышенное чувство достоинства и стремление к доминированию с неуверенностью в себе и избыточной самокритичностью. Стеничный регистр эмоций гнева, восхищения, гордости и презрения с эмоциями астенического регистра — страхом, чувством вины, тревожностью. Все это, с одной стороны, способствует взаимной компенсации одних черт другими, с другой — нагнетает напряженность. Внешне поведение может выглядеть как сбалансированное.



Мужчина 38 лет

Весь профиль расположен высоко.

Очень высокие шкалы индивидуалистичности (8), ригидности (6), пессимистичности (2).

Довольно высокие шкалы эмоциональной лабильности (3) и импульсивности (4).

Личность обладает обособленно-созерцательной позицией, аналитическим складом ума; склонность к раздумьям превалирует над чувствами; целостный стиль восприятия, способность на основании минимальной информации воссоздавать целостный образ. При наличии высокого интеллекта личности данного типа отличаются творческой ориентированностью, оригинальностью высказываний и суждений, интересов и увлечений. Возможна определенная избирательность в контактах, субъективизм в оценке людей и явлений окружающей жизни, независимость взглядов, тропизм к абстракции, высокая потребность в актуализации своей индивидуалистичности. Возможны трудности в адаптации к обычной жизни, быту. Больше ориентируются на свой субъективизм и интуицию. Есть риск агрессивного поведения.

На достаточно высоком уровне раздражительность, обидчивость, «застревание» на негативных переживаниях, проблемах, повышенная осторожность и недоверчивость, высокий уровень соперничества.

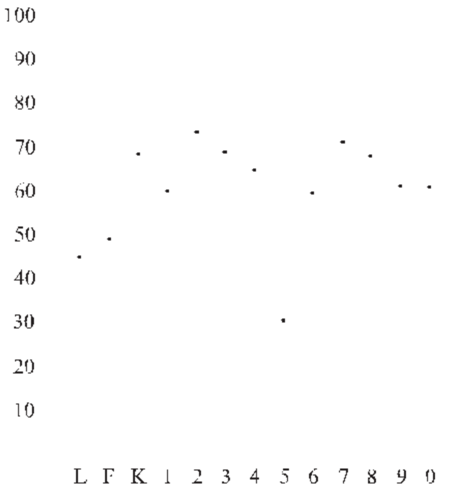
В силу всего вышесказанного возможны проблемы с окружающими.

На момент обследования профиль показывает дезадаптивное депрессивное состояние (возможно острое переживание чего-то), чувство отчаяния.

Сложная структура личностных особенностей (сочетание 4, 2) ослабляет агрессивность, нонкон-

формизм, импульсивность, т. е. есть контроль сознания над поведением. Кроме того, профиль показывает (2, 4) сочетание высокого уровня притязаний с неуверенностью в себе, высокой активности — с быстрой истощаемостью.

Возможна достаточно выраженная эстетическая ориентированность, богатое воображение, эмоциональность, впечатлительность (5, 3, 8).



Женщина 38 лет

Высокие шкалы: пессимистичности (2), тревожности (7), эмоциональной лабильности (3), а также индивидуалистичности (8) и повышенные — импульсивности (4) и ригидности (6). Достаточно низкая 5-я шкала — женственности–мужественности.

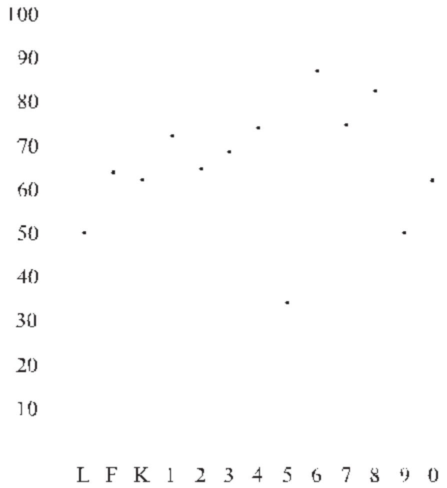
Профиль личности показывает очень чуткое реагирование на внешнее окружение, склонность к волнениям и переживаниям, даже пессимизму (2, 7, 3)* и высокую индивидуалистичность, активную личностную позицию, высокую поисковую активность, упорство в отстаивании собственного мнения, трезвый взгляд на жизнь (8, 4, 6).

В целом профиль показывает глубокую дисгармоничность, так как отражает парадоксальное сочетание ориентировки на актуальное поведение, на внешнюю оценку, на одобрение окружающих (2, 3, 7)* со склонностью строить свое поведение, исходя из внутренних критериев, и трудностями межличностной коммуникации (8, 4, 6).

Такое сочетание (при достаточно выраженном подъеме профиля) почти всегда говорит о легкости возникновения декомпенсаций. Не исключено, что, будучи обеспокоенными вопросами своего места в обществе и собственной значимости, личности такого типа нередко формируют круг своих контактов так, чтобы создать своеобразную среду, в которой их значимость безоговорочно признавалась бы.

* Ортодоксальный тип женского стиля поведения (т. е. стремление быть опекаемой, мягкость, сентиментальность) — низкая 5-я шкала.

Кроме того, сочетание некоторых шкал (↓5, ↑3, 8) говорит о выраженной эстетической ориентированности, богатом воображении, эмоциональности, впечатлительности.



Женщина 51 года

Высокие шкалы: ригидности (6), индивидуалистичности (8), тревожности (7), импульсивности (4), низкая 5-я шкала (женственности–мужественности).

Шкалы коррекции говорят о выраженном эмоциональном напряжении, вызванном стремлением к самокомпенсации при наличии серьезных проблем.

Если отвлечься от высокой расположенности профиля и считать его не выходящим за рамки нормального разброса, то он выявляет устойчивость интересов, упорство в отстаивании собственного мнения, активность позиции, усиливающуюся при воздействии внешних сил, практичность, трезвость взглядов на жизнь, стремление к опоре на собственный опыт, любовь к аккуратности, верность своим принципам, прямолинейность и упорство в их отстаивании. Изобретательность и рациональность склада ума сочетаются с его недостаточной гибкостью и трудностями переключения при внезапно меняющейся ситуации. Ей импонирует точность и конкретность, раздражает аморфность, неопределенность, безалаберность и неаккуратность. В силу своей ригидности (негибкости) может быть злопамятность, ревнивость, подозрительность, чувство соперничества, длительное переживание чувства обиды (6).

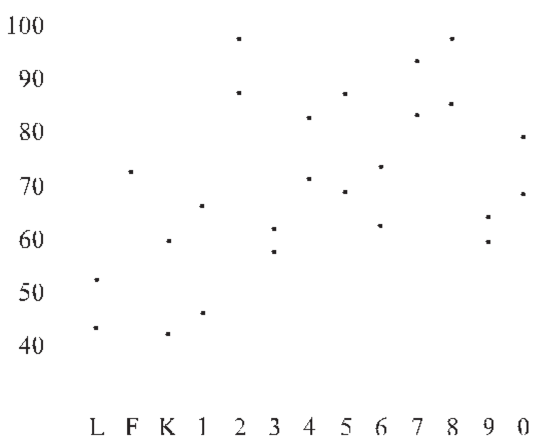
При достаточно высоком интеллекте, скорее всего, действует механизм интеллектуальной переработки и ограничительного поведения, направленного на избегание неуспеха (8, 7) (осторожность, осмотрительность и т. д.).

Низкая 5-я шкала демонстрирует ортодоксальный женский стиль поведения с эстетической ориентированностью, богатым воображением, эмоциональностью, впечатлительностью (↓5, ↑8, 3).

Таблица 22.2. Личностные характеристики, измеряемые шкалами MMPI [Чепкасов, 1992. С. 66]

Обозначение шкалы	Название шкалы	Содержание признака
1Hs	Ипохондрия	Озабоченность состоянием своего физического и психического здоровья
2D	Депрессия	Склонность к пониженному настроению и самооценке, тревожность, тенденция к самообвинению
3Hy	Истерия	Потребность в одобрении со стороны окружающих, демонстративность, вытеснение факторов, вызывающих тревогу
4Pd	Психопатическая девиация	Импульсивность, смелость, склонность к пренебрежению социальными нормам и сила влечений
5Mf	Мужественность/ женственность	Выраженность черт характера, свойственных противоположному полу
6Pa	Паранойя	Эмоциональная ригидность, подозрительность, злопамятность, склонность к обвинению окружающих
7Pt	Психастения	Контролируемость влечений, склонность к навязчивым сомнениям, слабость вытеснения, педантичность
8Sc	Шизофрения	Замкнутость, своеобразие (нестандартность) восприятия и суждений, слабость и неадекватность эмоционального реагирования, богатый «внутренний мир», аутичность
9Ma	Гипомания	Повышенное настроение и самооценка, пренебрежение трудностями, энергичность, доминирование, легкость и поверхностность контактов, широта интересов
0Si	Социальная интроверсия	Трудность межличностных контактов
	Шкалы коррекции (названия в стандарте методики отсутствуют)	
L	(Ложь)	Тендения представить себя в выгодном свете
F	(Аггравация)	Тревожность, психическая напряженность, склонность преувеличивать свои затруднения и переживания
K	(Диссимуляция)	Стремление игнорировать внутренние конфликты и переживания

Рисунок 22.2



Профили MMPI у двух монозиготных близнецов, страдающих шизофренией [Gottesman, Shields, 1972. P. 274]

Рисунок 22.3

Профили MMPI у двух групп дизиготных близнецов [Gottesman, Shields, 1972. P. 268].

Каждая пара была разделена, и по одному представителю вошли либо в группу «А», либо в группу «В». В группу «А» отбирали страдающих шизофренией, в группу «В» вошли их партнеры по парам, и для них этот диагноз еще не был поставлен

с интровертивными тенденциями. В дальнейшем оказалось, что часть утверждений психически больных разделяют и нормальные индивидуумы, и, таким образом, при помощи MMPI можно обнаруживать нормальные вариации личностных характеристик у психически здоровых людей, а шкалы MMPI называют уже мерами не синдромов, а свойств личности (табл. 22.2, дополнение 22.1).

Существуют различные независимые данные, демонстрирующие влияние наследственности на общий профиль по тесту MMPI. Показано значительно большее сходство по общему профилю MMPI для монозиготных близнецов, чем для дизиготных. В ряде других исследований продемонстрировано значительное сходство оценки наследуемости шкал 6Pa, 7Pt, 8Sc и 9Ma. На рис. 22.2 показаны профили двух монозиготных близнецов, страдающих шизофренией. Очевидно, что качественно они почти совпадают. У дизиготных близнецов такого сходства нет (рис. 22.3).

Литература к разделу 22.2

Березин Ф. Б., Мирошников М. П., Рожанец Р. В. Методика многостороннего исследования личности (в клинической медицине и психогигиене). М.: Медицина, 1976. 175 с.

Чепкасов И. Л. Генетический анализ психометрических характеристик человека: Дис. … канд. биол. наук. Новосибирск, 1992. 233 с. (Ин-т цитологии и генетики СО РАН).

Bouchard T. J., Jr. Genes, environment, and personality // Science. 1994. Vol. 264. P. 1700–1701.

Gottesman I. I., Shields J. Schizophrenia and genetics. A twin study vantage point. New York; London: Academic Press, 1972. P. 259–291.

22.3. ИНТЕЛЛЕКТ И КОЭФФИЦИЕНТ УМСТВЕННОГО РАЗВИТИЯ (I.Q.)

Интеллект можно определить как общую способность, проявляющуюся в решении большого круга задач и формировании связей между идеями, концепциями и т. д. Личностями высокого интеллекта следует считать тех, кто способен формировать большое число связей и уже имел возможность (через опыт, образование и т. д.) проявить свои способности [Sternberg, 1982].

Уровень интеллекта можно определить разными методами. Один из них — вычисление I.Q. (intelligence quotient) — показателя умственного развития на основе способности к быстрому решению стандартных несложных задач, которые составлены так, чтобы результаты их решения давали возможность выявлять и измерять такие первичные способности, как умение логически мыслить, запоминать и представлять предметы в трех измерениях. Некоторые типовые вопросы и правильные ответы приведены в дополнении 22.2.

Разработаны вопросы и для тестирования детей. Детям ставят различные задачи и определяют, каких способностей можно ожидать от детей каждого возраста в норме. Затем при проведении испытания ребенку предлагают все более трудные задачи, пока наконец он оказывается не в состоянии решить их. При помощи таких тестов было выявлено огромное разнообразие умственных способностей в каждой возрастной группе — от полной неспособности до превосходного понимания. Совершенно очевидно, что шестилетний ребенок, который справляется с задачами, обычно решаемыми восьмилетними детьми, превосходит по своим способностям ребенка шести лет, способного решать лишь те задачи, которые нормально решают дети этого возраста. Определенный таким образом «умственный возраст» делят на хронологический возраст ребенка и, умножая частное на 100, получают значение I.Q.

Если определить I.Q. у большого числа лиц, то они распределяются по нормальной кривой с амплитудой от 0 до 140 и более [Вилли, 1966. С. 536]:

140 и выше	Одаренные
120–140	Очень способные
110–120	Способные
90–110	Нормальные
80–90	Неспособные
70–80	Пограничный класс
Слабоумные	
50–70	Дебилы
25–50	Имбецилы
0–25	Идиоты

При этом наибольшее число значений приходится на нормальные классы, а в обе стороны число их прогрессивно уменьшается.

Лиц с I.Q. менее 70 называют слабоумными и различают три степени слабоумия. Лица с I.Q. от 50 до 70, называемые дебилами, не способны самостоятельно вести свои дела, но могут выполнять простые задания и частично сами себя содержать. Лица с I.Q. от 25 до 50 имеют «умственный возраст» 3–7 лет и называются имбецилами. Они не способны зарабатывать себе на жизнь, но могут обслуживать самих себя. Наконец, лица, «умственный возраст» которых соответствует 1–2 годам и I.Q. у которых

Дополнение 22.2

Приведены простейшие тесты из большого сборника, используемого для определения величины I.Q.

1. Подберите слово, подходящее для окончания первого слова и начала второго.

ОБЫ(…)КА

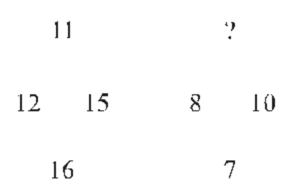
Ответ: ЧАЙ.

2. Расшифруйте слова и исключите лишнее слово.

ААЛТЕРК
КОЖАЛ
ДМОНЧЕА
ШКААЧ

Ответ: ЧЕМОДАН. Остальные слова расшифровываются: ТАРЕЛКА, ЛОЖКА, ЧАШКА — посуда.

3. Найдите закономерность и впишите недостающее число.



Ответ: 11. Вычесть число на полу из суммы чисел на окнах.

4. Найдите закономерность и впишите нужное слово.

БАГОР (РОСА) ТЕСАК
ГАРАЖ (...) ТАБАК

Ответ: ЖАБА. 1-я и 2-я буквы искомого слова — это 5-я и 4-я буквы предшествующего слова. 3-я и 4-я буквы искомого слова — это 3-я и 4-я буквы последующего слова.

5. Найдите закономерность и подставьте число.

196 (25) 324
325 (...) 137

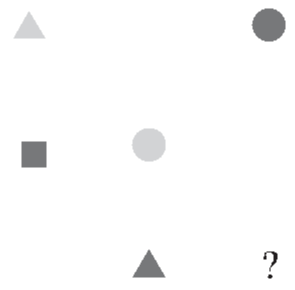
Ответ: 21. Сложить все цифры, стоящие вне скобок.

6. Найдите закономерность и подставьте число.

18 10 6 4 ?

Ответ: 3. Каждое последующее число получается, если к предыдущему прибавить 2 и результат разделить на 2, т. е. 4 + 2 = 6, 6 : 2 = 3.

7. Найдите закономерность и изобразите отсутствующую фигуру.



Ответ:

В каждом ряду есть по одному большому кругу, треугольнику и квадрату, значит, отсутствует большой треугольник. Внутри больших фигур располагаются маленькие треугольник, круг и квадрат. В нижнем ряду не хватает квадрата. Аналогично с цветами маленьких фигур.

Каждый правильный ответ оценивается баллом. Испытуемый за фиксированное время решает задачи и набирает баллы. По калибровочной кривой баллы переводятся в значения I.Q. [Универсальные тесты..., 1996].

ниже 25, называемые идиотами, не могут выполнять даже простейших функций — самостоятельно принимать пищу и обслуживать себя.

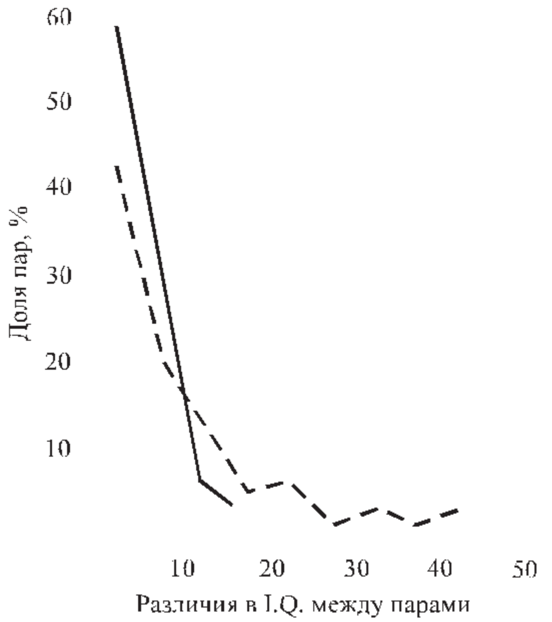
Насколько значения I.Q., обнаруженные у родителей, возможно обнаружить у их потомков? Вопрос этот бурно обсуждается. Приведем 2 мнения.

1. Американский психолог А. Дженсен впервые предположил в 1969 г., что: 1) образование не компенсирует интеллектуального провала, 2) различия между неграми и белыми в американском обществе сильно зависят от генетических факторов.

2. Психолог Л. Кэймин (1974) считает, что не существует данных, которые заставили бы разумного человека принять гипотезу о том, что результаты теста I.Q. в какой-то степени наследственны. По мнению крупного американского генетика Р. Левонтина, высказанному в 1976 г., заключения о наследственности показателей I.Q. следует считать расистскими (см. также дополнение 22.3).

В самом деле, довольно трудно установить возможность передачи тех же самых значений I.Q. от родителей потомкам, поскольку интеллект складывается из множества факторов и в каждом мейотическом делении эти комби-

Рисунок 22.4



Внутрипарные различия в значениях I.Q. у однояйцовых (непрерывная линия) и разнояйцовых (пунктирная линия) близнецов [Канаев, 1968. С. 57].

Изучали по 50 пар однояйцовых и разнояйцовых близнецов

нации в значительной степени рассыпаются. Однако с помощью близнецового метода можно определить, насколько те или иные способности определяются генотипом.

Наиболее надежные сравнения интеллекта можно делать на особях, имеющих полностью одинаковый генотип, — на монозиготных близнецах (см. разд. 4.7).

В исследованиях по слабоумию показано, что если один из дизиготных близнецов слабоумен, то второй оказывается слабоумным лишь в 25 % случаев. Если же слабоумен один из пары монозиготных близнецов, то второй оказывается таким же почти всегда. Монозиготные близнецы значительно более сходны между собой в отношении умственных способностей, чем дизиготные; между монозиготными близнецами, выращенными порознь, имеется в этом отношении большее сходство, чем между дизиготными, воспитывавшимися вместе.

Дети, воспитывающиеся вместе в сиротских приютах, где внешние условия для них почти совершенно одинаковы, обнаруживают такое же большое разнообразие умственных способностей, как и дети, воспитывающиеся порознь в разных семьях. Даже когда детей усыновляют в младенчестве, то наблюдается значительно большая корреляция в одаренности между ребенком и его истинными (биологическими) родителями, чем между ребенком и его приемными родителями. Поэтому можно сделать вывод, что верхний предел умственной одаренности человека обусловлен генотипически, степень же развития этих наследственных способностей определяется внешними влияниями — обучением и опытом [Вилли, 1966].

При внутрипарных сравнениях монозиготных близнецов по различным признакам, характеризующим интеллект (I.Q.), около 60 % пар обнаруживают разницу в 2,5 балла, остальные 40 % — от 2,5 до 15 баллов. При аналогичных сопоставлениях дизиготных близнецов 40 % пар имеют разницу в 2,5 балла, 20 % — 7,5 балла, остальные 40 % — от 7,5 до 45 баллов (рис. 22.4).

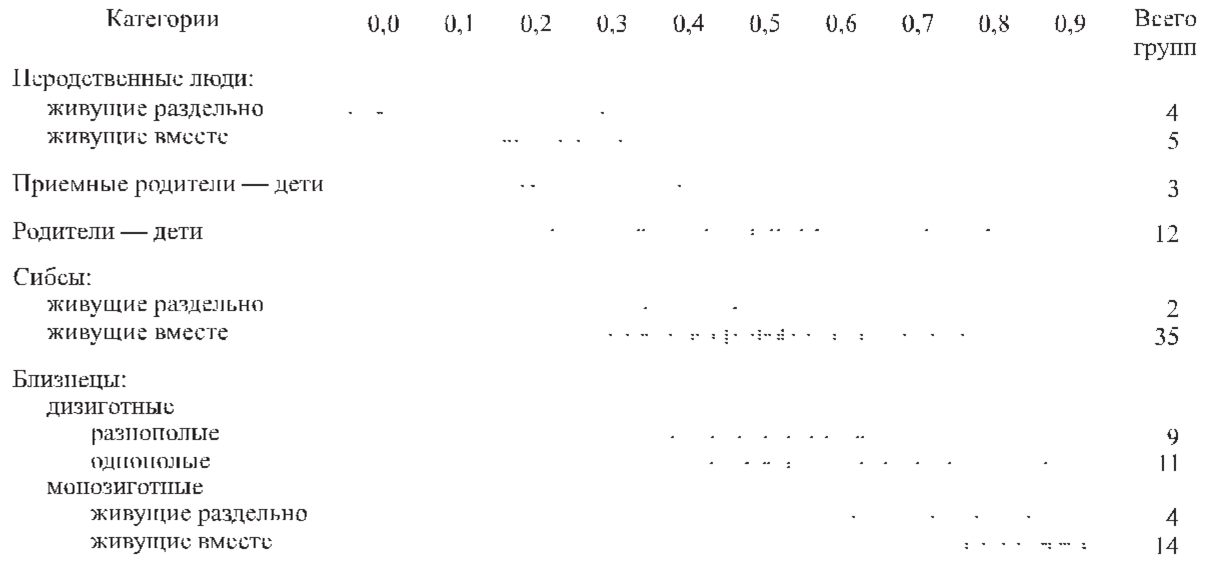
Всегда интересными являются результаты сопоставления проявления признаков у монозиготных близнецов, воспитанных в разных семьях. Различия в показателе I.Q. у монозиготных близнецов, даже живущих в различных условиях, ниже, чем у близнецов или просто у детей одного пола, воспитываемых в одних и тех же условиях [Newman et al., 1937. — Из: Srb et al., 1965. P. 521]:

Монозиготные близнецы (50 пар)	5,9
Дизиготные близнецы (52 пары)	9,9
Пары детей одного пола (47 пар)	9,8
Идентичные близнецы, живущие раздельно (19 пар)	8,2

О возможности генетического контроля определенного уровня интеллектуальных способностей свидетельствуют результаты следующих экспериментов. Определяли коэффициенты корреляции по I.Q. между группами людей, состоящих в разной степени родства (рис. 22.5).

Оказалось, что самая низкая сцепленность проявления найдена у людей из неродственных групп. У них коэффициент корреляции составляет 0–0,3. Корреляция этого признака у приемного отца и ребенка также невелика — в пределах 0,15–0,35. Корреляции между отцом и любым из родных детей значительно выше — 0,2–0,8. Широкий размах варьирования может свидетельствовать о зависимости этого признака от расщепления хромосом. У дизиготных близнецов коэффициенты корреляции еще выше — 0,35–0,85. Особый интерес представляют данные о корреляциях в проявлении интеллекта у монозиготных близнецов, особенно если есть возможность сравнить между собой братьев и сестер, которых от рождения воспитывали в разных семьях. В данном случае один

Рисунок 22.5



Коэффициент корреляции по проявлению I.Q. между разными группами людей, различающихся по степени родства [Sternberg, 1982. P. 830].

Вертикальными линиями отмечено положение среднего значения

и тот же генотип реализуется в разных условиях окружающей среды. У монозиготных близнецов, развивавшихся раздельно, коэффициент корреляции варьировал в пределах 0,6–0,85, при совместном воспитании значения были 0,75–0,95. Различия в 0,10–0,15 можно целиком отнести на счет окружающей среды. Видно, что это влияние невелико и основной вклад

Дополнение 22.3

«Результаты обследования населения США на предмет I.Q. приведены в книге Чарльза Меррея и Ричарда Хернстейна „Изгиб колокола“. Оказывается, президент Джон Кеннеди имел коэффициент I.Q., оцениваемый в 119 баллов, эстрадная звезда Мадонна — 140. Огромный 125-миллионный средний класс американцев держится где-то в пределах нормы (90–110 баллов). Примерно четверть населения США (62,5 миллиона человек) относится к категории тупых или очень тупых, и черные американцы в этой группе составляют подавляющее большинство. Хотя и выходцев из Латинской Америки, так называемых „латинос“, в этой группе немало. По данным книги, между белыми и черными зияет брешь в 15 баллов. Авторы книги видят в этой группе причину большинства социальных патологий, таких как: нищета, зависимость от пособий, незаконнорожденные дети, преступность. Интеллектуальный разрыв между белыми и черными — не открытие Меррея и Хернстейна. Однако причины этого ранее относили за счет окружающей среды, социальных условий, недостатка образования. Авторы „Изгиба колокола“ говорят однозначно: основная причина — наследственная.

Если выводы этих ученых верны, то решительному пересмотру должна подвергнуться одна из самых амбициозных программ США — „Великое общество“. По мнению авторов, она развращает негритянское население пособиями, которые не приводят ни к чему иному, как к деградации, стремительному размножению недоумков и криминализации негритянской общины.

Однако и это не все. Перенос акцента с социального объяснения причин классового неравенства на биологические делает необходимым раздельные школьные программы, неодинаковый подход к служебному продвижению и даже возвращение к практике апартеида. Негритянские ученые и обозреватели назвали работу „Изгиб колокола“ расистской, предсказав, что она не выдержит научной критики. Ряд крупных исследователей, включая двух лауреатов Нобелевской премии в области биологии и психологии, поддержали Меррея и Хернстейна. Американская медиа почти не обратила внимания на то, что белые, пусть и незначительно, но по критерию I.Q. отстают от выходцев из Азии»

(В. Надеин. Газета «Известия», 2 ноября 1994 г.).

в формирование интеллектуальных характеристик вносит генотип.

Такие сопоставления ясно свидетельствуют о том, что люди с одинаковыми генотипами имеют очень близкие показатели I.Q.

Из определения понятия «интеллект» можно сделать два важнейших вывода: 1) высокий интеллект (I.Q.) может быть у людей, занятых в самых разнообразных сферах деятельности; 2) в каждой сфере деятельности возможно формирование элитарного слоя. Этот слой, его качество и численность, играет определяющую роль в обществе.

Общество можно считать высокоразвитым, если в нем существует элита среди политических деятелей, ученых, врачей, учителей, адвокатов, военных, священников, рабочих, крестьян. Известно выражение А. Сен-Симона: «Уберите по 50 лучших в каждой профессии — и Франции не будет».

В России на протяжении XX в. в ходе мировых и гражданских войн, революций, локальных конфликтов, коллективизации, репрессий и массовой эмиграции происходило уничтожение наиболее активной части общества. Это, по мнению А. П. Акифьева (1991), должно было «крайне обеднить его генный потенциал».

Литература к разделу 21.3

Вилли К. Биология. М.: Мир, 1966. С. 533–537.

Канаев И. И. Близнецы и генетика. Л.: Наука, 1968. С. 57–58.

Универсальные тесты профессора Айзенка. СПб.: Стелла, 1996. 142 с.

Handbook of human intelligence / R. J. Sternberg (ed.). Cambridge; London; New York: Cambridge University Press, 1982. P. 3–122, 823–872.

22.4. СФЕРЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

22.4.1. Склонности к профессиональной деятельности

Каким образом генотип человека может влиять на выбор профессии, профессиональную деятельность и социальное поведение? Какова роль воспитания и обучения в этих процессах?

Интересно пронаблюдать специальные способности близнецов. И. И. Канаев [1968] пишет: «Сохранилось описание двух близнецов-музыкантов Иоганна Христофора и Иоганна Амбросиуса Бахов. Последний был отцом И. С. Баха. Сын Баха описывает дедов: „Речь, образ мысли — все у них было одинаково. В музыке также их нельзя было отличить. Они одинаково играли, одинаково развивали тему. Если один болел, то болел и другой. Они умерли вскоре один за другим».

В Германии еще недавно жили два оперных дирижера-близнеца, Вольф и Вилли Хайнцы. Не только внешне, но и в музыкальном смысле они были столь идентичны, что даже их учитель не мог их различить. Однажды они готовили одну и ту же оперу каждый в своем театре. Сходство близнецов в смысле интерпретации и манере дирижировать было так велико, что один из них мог заменить другого после антракта, и никто из исполнителей (певцов или оркестрантов) и зрителей не замечал, что дирижирует другой человек».

Были проведены сопоставления пар моно- и дизиготных близнецов по признакам, характеризующим предрасположенность к определенным сферам занятий, таким как наука, бизнес, религиозная или артистическая деятельность. Результаты показали, что у монозиготных близнецов коэффициенты корреляции между проявлением одинаковых признаков значительно выше, чем у дизиготных близнецов (рис. 22.6). Таким образом, условия жизни (родители, окружение, воспитание) были одинаковы, но у монозиготных близнецов корреляции в поведенческих реакциях существенно выше.

Дополнение 22.4

В метком и остром русском языке можно найти по крайней мере четыре поговорки, имеющие непосредственное отношение к генетике и возникшие, по-видимому, задолго до открытия менделевских законов:

«Яблоко от яблони недалеко падает».

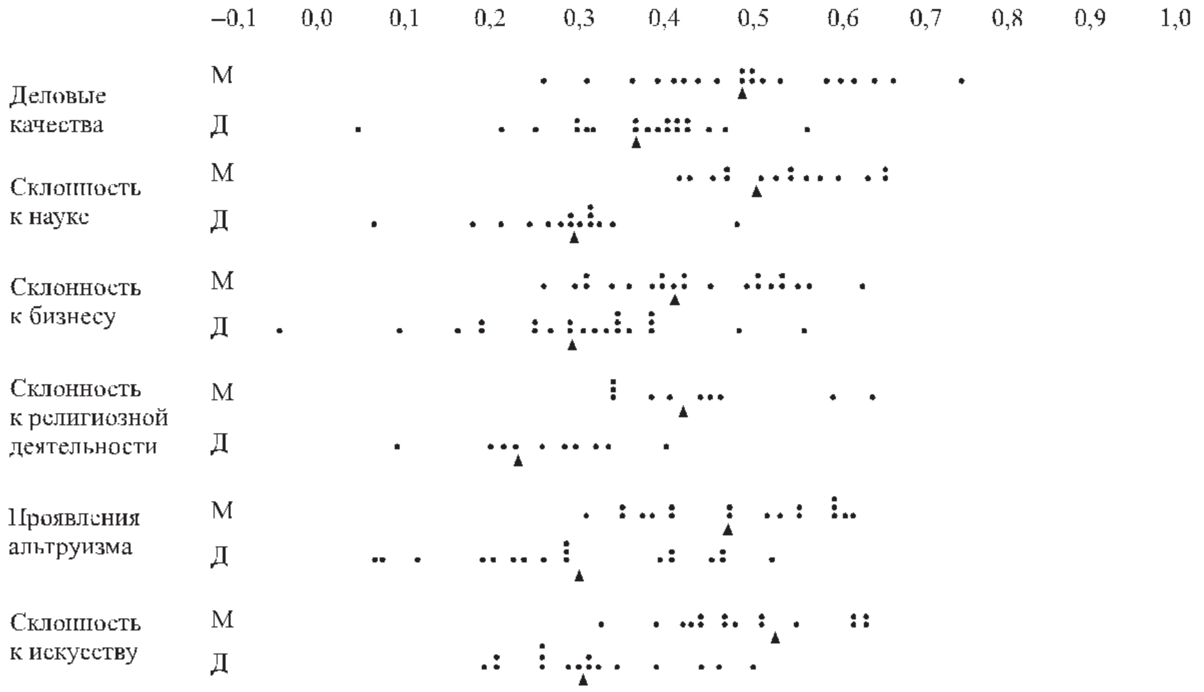
«Из худого семени не получишь доброго племени».

«Горбатого могила исправит».

«Сколько волка не корми — все в лес смотрит».

Если первые две поговорки касаются общих вопросов наследственности, то две последние однозначно характеризуют отношение народа к роли обучения и воспитания в поведении.

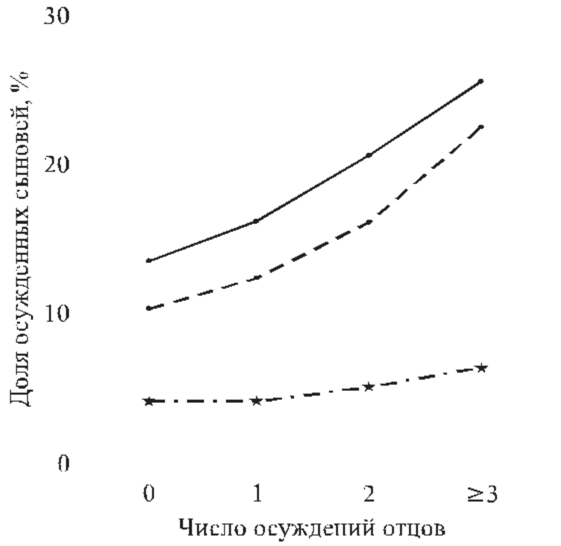
Рисунок 22.6



Внутриклассовые корреляции между проявлением интересов к разным видам занятий у монозиготных (М) и дизиготных (Д) близнецов [Sternberg, 1982. P. 828].

Коэффициенты корреляции, полученные в каждом отдельном эксперименте, обозначены точками. Средневзвешенный коэффициент корреляции указан стрелкой в каждой группе. Длина горизонтальной линии отражает разброс коэффициентов корреляции в группе

Рисунок 22.7



Корреляция частоты осуждения сыновей, воспитывавшихся в чужих семьях, и частоты осуждения биологических отцов [Mednick et al., 1984. P. 892].

Штриховая линия — воровство, штрих-пунктирная — тяжелые преступления, сплошная — оба вида преступлений

22.4.2. Криминальное поведение

При анализе предрасположенности к совершению преступлений был использован семейный метод. Предположение, что генетические факторы могут быть среди причин криминального поведения, было проверено на 14 427 осужденных приемных детях путем сравнения их с биологическими и приемными родителями. Никакой корреляции не было обнаружено между приемными детьми и родителями. Однако установлена достоверная корреляция между частотой привлечения к уголовной ответственности детей и числом осуждений у их биологических отцов (рис. 22.7).

Таким образом, обстановка приемной семьи мало повлияла на развитие наклонностей приемыша.

Многие авторы пытались анализировать склонность к преступлениям, используя близнецовый метод (некоторые результаты представлены в табл. 22.3). Данные таблицы свидетельствуют, что если один из пары близнецов совершает преступление, то вероятность того, что и второй близнец преступник, значительно выше для монозиготных, чем для дизиготных близнецов.

Таблица 22.3. Сравнение преступного поведения монозиготных и дизиготных близнецов [Эфроимсон, 1971. — Из: Инге-Вечтомов, 1989. С. 504]

Автор, год исследования	Страна	Монозиготные			Дизиготные		
		Число пар	Второй близнец		Число пар	Второй близнец	
			тоже преступник	не преступник		тоже преступник	не преступник
Ланге, 1929	Германия	13	10	3	17	2	15
Легра, 1932	Голландия	4	4	0	5	0	5
Кранц, 1936	Германия	31	20	11	43	23	20
Штумпфль, 1939	Германия	18	11	7	19	7	12
Боргстрем, 1939	Финляндия	4	3	1	5	2	3
Розапов и др., 1941	США	45	35	10	27	6	21
Иосимасу, 1957	Япония	28	14	14	26	0	26
Хайяси, 1967	Япония	15	11	4	Данные недостаточны		
Христиансен, 1968	Дания	91	48	43	122	29	93
Суммарные данные		249	156 (62,6 %)	93	264	69 (25,4 %)	195

22.4.3. Предрасположенность к алкоголизму

С середины XIX в. изучают предрасположенность к алкоголизму. Уже в начале XX в. по результатам анализа 4000 алкоголиков, которых на протяжении 35 лет лечили в одной из клиник, было показано, что эта болезнь имеет «семейные корни». Более чем за 80 лет после этой первой публикации основные ее выводы имели все новые и новые подтверждения. Однако «семейные» еще не значит «наследственные». И здесь близнецовый метод анализа дал хорошие результаты. Наиболее известная работа проведена во второй половине XX в. на 902 парах близнецов из финляндской популяции. Анализировали алкоголиков по трем показателям: а) частоте выпивок, б) количеству выпитого и в) степени потери контроля над собой при опьянении.

Только по последнему признаку не было обнаружено генетической детерминированности. По первым двум признакам коэффициенты корреляции составляли 0,39 и 0,40 соответственно. Аналогичные данные были получены несколько позже опять на финской, на шведской и на американской группах близнецов.

Анализ семей с приемными детьми показал, что около 5 % детей становятся алкоголиками, если ни у биологических родителей, ни в приемных семьях алкоголизм не отмечен. Однако уже 18 % (в 3,5 раза чаще) приемных детей становятся алкоголиками, если у биологических родителей встречался алкоголизм, а в приемных семьях — нет.

Литература к разделу 22.4

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. 504 с.

Канаев И. И. Близнецы и генетика. Л.: Наука, 1968. С. 57–58.

Devor E. J., Clonninger C. R. Genetics of alcoholism // Ann. Rev. Genet. 1989. Vol. 23. P. 19–36.

Handbook of human intelligence / R. J. Sternberg (ed.). Cambridge; London; New York: Cambridge University Press, 1982. P. 827.

Karlsson J. L. Genetic basis of intellectual variation in Iceland // Hereditas. 1981. Vol. 95. P. 283–288.

Mednick S. A., Gabrielli W. F. Jr., Hutchings B. Genetic influences in criminal convictions: evidence from an adoption cohorn // Science. 1984. Vol. 224. P. 891–893.

Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S. General genetics. San Francisco; London: W. H. Frecman and Company, 1965. P. 521–524.

Глава 23
НЕХРОМОСОМНАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ

23.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

До сих пор мы рассматривали сведения об организации и функционировании генов, расположенных в хромосомах, т. е. в ядре. Наследование этих генов подчинено менделевским закономерностям. Наряду с этим существует внеядерная, или неменделевская, наследственность, обусловленная молекулами нуклеиновых кислот, реплицирующихся в цитоплазме в виде автономных структур либо в составе клеточных органелл.

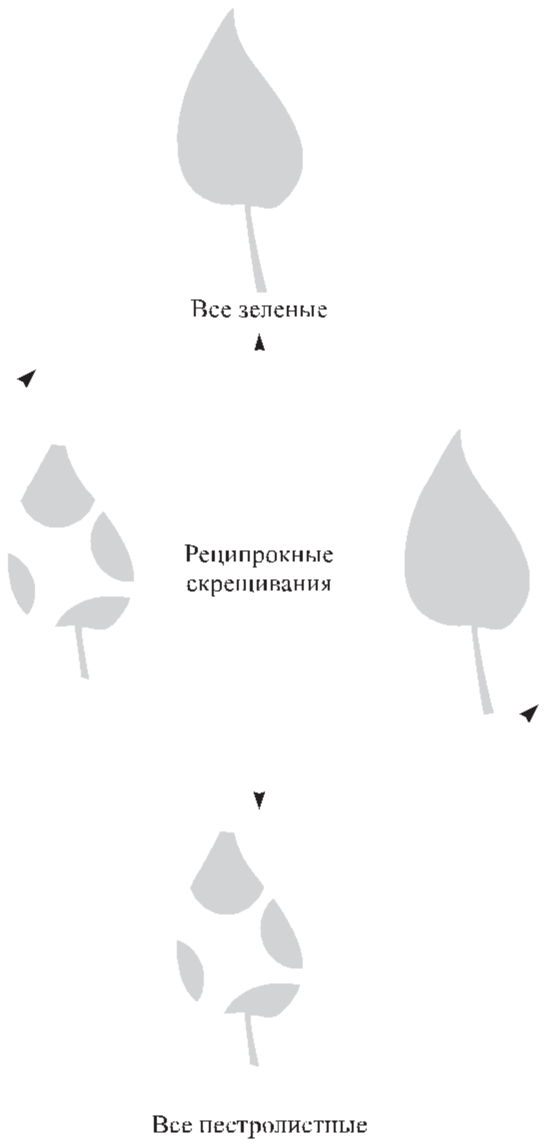
О первых фактах пластидной наследственности сообщили в 1908–1909 гг. К. Корренс и Э. Баур в результате изучения пестролистности у растений — ночной красавицы *Mirabilis jalapa* и герани *Pelargonium zonale*. У ночной красавицы есть экземпляры, которые могут иметь чисто зеленые, белые и пестролистные ветви. При опылении цветков с пестролистных ветвей пыльцой от цветков с зеленых и при реципрокном скрещивании результаты получались различными (рис. 23.1).

Если участвовавшая в скрещиваниях материнская форма была пестролистной, а отцовская — зеленой, то все потомство оказывалось пестролистным. В реципрокном скрещивании, когда материнская форма имеет зеленые листья, а отцовская — пестролистная, все потомство становится зеленым. Налицо противоречие тому, что наблюдал Мендель. В его опытах реципрокные скрещивания давали одинаковый результат.

Если потомство от скрещивания материнской пестролистной формы вновь опылить пыльцой от зеленой формы, потомство снова будет пестролистным. Очевидно, что наследование пестролистности связано не с хромосомами, а со структурами цитоплазмы. Такими структурами оказались пластиды, в которых локализован хлорофилл.

Пестролистность обусловлена наличием двух типов пластид: способных к образованию хлорофилла (хлоропластов) и не способных (лейкопластов). Вследствие этого иногда на растении образуются чисто зеленые или белые

Рисунок 23.1



Разные результаты в реципрокных скрещиваниях при наследовании пестролистности у ночной красавицы *Mirabilis jalapa* — первый пример нехромосомного (пластидного) наследования [Инге-Вечтомов, 1996]

Рисунок 23.2

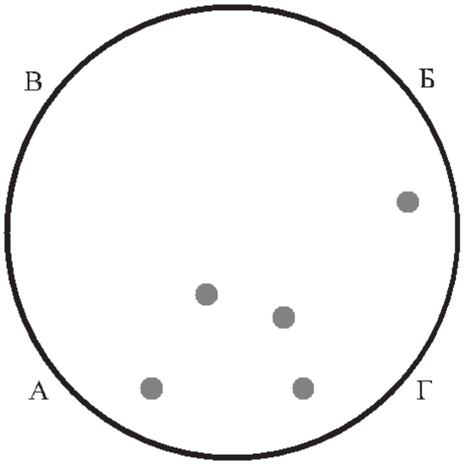


Схема случайного распределения белых и зеленых пластид при клеточном делении [Мюнтцинг, 1967. С. 454].

Если новая клеточная перегородка пройдет по линии А–Б, то одна клетка будет содержать исключительно белые пластиды, а другая – зеленые и белые. Если же клеточная стенка пройдет вдоль линии В–Г, то одна клетка будет содержать исключительно зеленые пластиды, а другая — смесь белых и зеленых

ветви. Пятнистые участки растения состоят из клеток, содержащих оба сорта пластид — зеленые и белые. Во время митоза пластиды распределяются между дочерними клетками случайно (рис. 23.2). Если определенная материнская клетка содержит и белые, и зеленые пластиды, то дочерняя клетка может получить либо только зеленые пластиды, либо только белые, либо смесь белых и зеленых в зависимости от того, где пройдет новая клеточная стенка.

Если данная клетка получила пластиды лишь одного типа, то все дочерние клетки будут также содержать пластиды одного этого типа, т.е. только зеленые или только белые. Мозаичность (пятнистость) будет встречаться лишь в том случае, если материнская клетка содержит оба типа пластид. Таким образом, эта модель позволяет объяснить наличие у пятнистой разновидности зеленых и белых участков ткани, а также тот факт, что после скрещивания с нормальным зеленым растением эта разновидность может дать три рода потомков в зависимости от того, какой тип пластид попал в яйцеклетку.

Пыльца, напротив, в этом отношении не оказывает какого-либо влияния на тип потомства. Если цветок на чисто белом побеге пятнистого растения опылен пыльцой нормальной зеленой разновидности, то потомство будет чисто белым, так как белый цветок содержит только белые пластиды, а пыльцевые зерна не передают зеленых пластид от отцовской разновидности.

Различия в результатах прямого и реципрокного скрещиваний объясняются тем, что у растений, как и у животных, спермий при оплодотворении фактически не вносит в зиготу заметных количеств цитоплазмы. Таким образом, наследование пестролистности связано в данном случае не с хромосомами ядра, а со структурами цитоплазмы, т.е. пластидами.

В настоящее время используют следующие критерии, позволяющие отличить внеядерную наследственность от хромосомной:

1) различия в результатах реципрокных скрещиваний;

2) наличие связи между наследованием определенных признаков и переносом в клетку определенной цитоплазматической ДНК;

3) невозможность выявить сцепленность определенных генов с хромосомными генами;

4) отсутствие типичного количественного менделевского расщепления признаков в потомстве, зависимого от расхождения гомологичных хромосом в мейозе;

5) независимость проявления признака от замены ядер в клетках.

К настоящему времени описано довольно много различных систем, связанных с передачей наследственных признаков через цитоплазматические структуры. Кроме уже упомянутых случаев мутирования хлоропластной ДНК, приводящих к пестролистности, это митохондриальные мутанты *poky* у нейроспоры и *petite* у дрожжей, явление цитоплазматической мужской стерильности у растений, наследование различных цитоплазматических паразитов и симбионтов и т. д.

Особенности организации пластидных и митохондриальных геномов были рассмотрены нами ранее (см. разд. 9.1).

Литература к разделу 23.1

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. М.: Высш. шк., 1985. С. 328–343.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев: Наук. думка, 1983. С. 170–191.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. С. 383–395.

Джинкс Дж. Нехромосомная наследственность. М.: Мир, 1966. 288 с.

Дубинин Н. П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. С. 396–405.

Инге-Вечтомов С. Г. Цитогены и прионы: цитоплазматическая наследственность без ДНК? // Соросовский образовательный журн. 1996. № 5. С. 11–18.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1989. С. 225–256.

Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. С. 519–550.

Мюнтцинг А. Генетика общая и прикладная. М.: Мир, 1967. С. 453–472.

Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М.: Мир, 1975. 419 с.

Caspari E. Cytoplasmic inheritance // Advances in Genetics. 1948. Vol. 2. 66 p.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addisson Wesley Longman Inc., 1998. P. 679–712.

23.2. ИЗУЧЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ЧЕЛОВЕКА

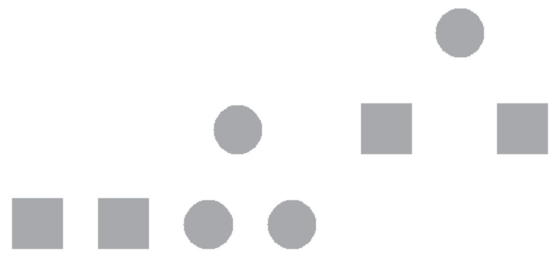
23.2.1. Болезни человека, связанные с дефектами мтДНК

Известен ряд болезней человека, возникающих вследствие мутаций в митохондриальной ДНК. Эти болезни наследуются по материнской линии (рис. 23.3). Некоторые из них вкратце описаны ниже.

Наследственная оптическая нейропатия Лебера. Болезнь проявляется у индивидуумов среднего возраста и заключается в полной или частичной слепоте из-за дегенерации зрительного нерва. Люди, предрасположенные к такому заболеванию, обычно имеют нормальное зрение от рождения; наступление слепоты происходит между 8 и 60 годами, в среднем в 27,6 ± 14,2 года. Причиной болезни является миссенс-мутация в одном из 18 митохондриальных генов, кодирующих белки ND1 (NADH дегидрогеназа), ND2, ND4, ND5, ND6, cytb, COI, COIII и ATP-азу. Эти белки входят в состав ферментных комплексов, обеспечивающих цепь передачи электронов в процессе окислительного фосфорилирования. Более чем в 50 % случаев заболеваний происходит транзиция G→A в положении 11 778 пн. В результате этой мутации аргинин в положении 340 белка ND4 заменяется на гистидин. Гибель оптического нерва является следствием дефектов окислительного фосфорилирования.

Синдром Кернса–Сэйра. Люди с этим синдромом обнаруживают энцефаломиопатию — заболевание мозга. Причиной развития этого синдрома являются большие делеции в различных участках мтДНК. Каждая делеция удаляет один или несколько генов тРНК, необходимых для митохондриального синтеза белка, что в конце концов приводит к развитию данного синдрома.

Рисунок 23.3



Материнский тип наследования одной из цитопатий (помечена серым), связанных с митохондриями

Болезнь миоклональной эпилепсии и разорванных красных волокон. Люди, страдающие этой болезнью, обнаруживают слабоумие, глухоту и апоплексические удары. Причиной болезни является замена одного нуклеотида в гене тРНК-лизин в позиции 8344 пн. Мутантная тРНК оказывает вредный эффект на синтез митохондриальных белков, что каким-то образом приводит к формированию различных проявлений этой болезни.

Гетероплазмия. В большинстве случаев болезней, связанных с дефектами мтДНК, клетки больных индивидуумов содержат смесь нормальных и мутантных митохондрий. Такое состояние называется гетероплазмией. Характерно, что пропорции двух типов митохондрий варьируют от ткани к ткани и от особи к особи в пределах одной родословной. Степень тяжести заболевания примерно коррелирует с относительным количеством мутантных митохондрий. Женщина с умеренным проявлением митохондриальной болезни может родить детей с варьированием степени заболевания от самой сильной до полного его отсутствия. Как могут происходить изменения в числе мутантных и нормальных митохондрий в клеточных делениях, показано на рис. 23.4.

По некоторым оценкам, частота встречаемости гетероплазмии в популяциях человека может достигать 10 % и даже 20 %. Гетероплазмия была найдена в мтДНК из эксгумированных останков русского царя Николая II. В одном и том же сайте ДНК контрольного района в одних случаях находили цитозин, в других — тимин. В мтДНК его родственников в данном сайте был только тимин. Это создало вопросы в точности идентификации останков. Проблема была решена, когда аналогичные различия нашли в мтДНК его брата, великого князя Георгия Романова. Оба брата

Рисунок 23.4

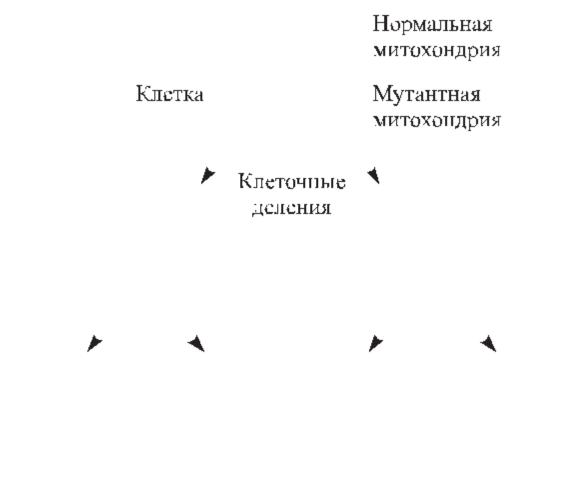


Схема наследования при гетероплазмии митохондрий

унаследовали гетероплазмию от матери. Аналогичная гетероплазмия была обнаружена не только у Николая II, но и у его ныне живущего родственника по материнской линии [Ivanov et al., 1996].

Литература к разделу 23.2.1

Ivanov P. L., Wadhams M. J., Roby R. K. et al. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes authenticity of the remains of Tsar Nicholas II // Nat. Genet. 1996. Vol. 12. P. 417–420.

Russell P. J. Genetics. 5th ed. Menlo Park, California: Addisson Wesley Longman Inc., 1998. P. 702–704.

Wallace D. C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? // Science. 1992. Vol. 256. P. 628–632.

23.2.2. Использование полиморфизма митохондриальных ДНК в качестве молекулярных маркеров

Отличие митохондриального генома от ядерной ДНК заключаются в том, что мтДНК наследуются строго по материнской линии, т. е. при отсутствии рекомбинации. В момент проникновения в яйцеклетку спермии утрачивают хвост с митохондриями, хотя небольшое число копий, примерно 100 мтДНК на спермий, оказывается в цитоплазме яйцеклетки, содержащей до 100 тыс. копий мтДНК. Однако возможный вклад отцовских мтДНК в следующее поколение избирательно блокируется на молекулярном уровне, и зигота приобретает только один набор мтДНК, содержащийся в цитоплазме яйцеклетки. Таким образом, митохондриальный геном эволюционирует посредством последовательного накопления мутаций.

Другой уникальной особенностью мтДНК является очень высокая скорость замен нуклеотидов в процессе эволюции. Установлено, что время фиксации мутаций в митохондриальном геноме примерно в 10–20 раз больше, чем в аналогичных по размеру последовательностях ядерных генов, детерминирующих те же ферментные комплексы окислительного фосфорилирования, а вариабельность последовательностей в контрольном районе оказалась в 3–4 раза выше, чем в кодирующем [Wallace, 1995]. Применительно к мтДНК млекопитающих предложена оценка скорости накопления нуклеотидных замен — 10^{-8} на сайт в год, или 0,01 замены на пару нуклеотидов за 1 млн лет, или 1 % за 1 млн лет при скорости мутирования 4×10^{-4} на сайт на поколение.

Высокая скорость мутирования делает митохондриальную ДНК более подходящей для анализа событий, происшедших недавно, а передача митохондрий по материнской линии позволяет полагать, что все изменения в составе нуклеотидов произошли за счет мутирования, а не рекомбинации.

После того как в 1981 г. в Кембридже был картирован весь митохондриальный геном европейца, для изучения полиморфизма в популяциях человека стали широко применять метод сравнительного картирования по длине фрагментов рестрикции (ПДРФ-анализ). Полиморфизм выявляется при сопоставлении индивидуальной мтДНК с эталонной («кембриджской») последовательностью по факту появления или исчезновения сайта рестрикции, обнаруживаемому после электрофореза продуктов рестрикции в агарозном геле. Каждое такое событие, т. е. приобретение или утрата сайта рестрикции, эквивалентно одной замене нуклеотида.

Данные по секвенированию индивидуальных мтДНК из разных популяций человека выявили высокую степень вариабельности контрольного района: вариабельные позиции сосредоточены в основном на 5'- и 3'-концах молекулы мтДНК. Гипервариабельные сегменты ГВС-1 (16000–16400) и ГВС-II (70–380) составляют примерно 710 пн контрольного района.

Обнаруживаемый полиморфизм, как по рестрикционным фрагментам, так и по последовательностям нуклеотидов, представлен тесно сцепленными (гаплоидными) наборами мутаций — гаплотипами («гаплотип» происходит от слов гаплоидный генотип). Тесно сцепленные гаплотипы образуют гаплогруппу. Все ви-

ды полиморфизма помогают идентифицировать индивидуумов, а также выявить родственные связи по материнской линии между людьми, что может быть использовано в криминалистике и антропологии.

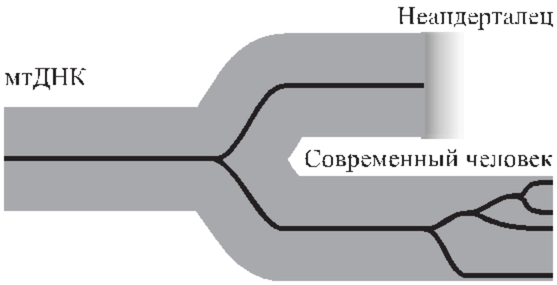
В 1987 г. Р. Кэнн (R. Kann) и ее коллеги из Калифорнийского университета в Беркли, проанализировав мтДНК 147 человек из Африки, Азии, Австралии и Новой Гвинеи, сопоставили полученные данные по полиморфизму рестрикционных фрагментов и построили эволюционные «деревья». Результаты оказались неожиданными в нескольких отношениях. Во-первых, обнаружена континентальная специфичность гаплотипов мтДНК. В частности, сайт рестрикции *Hpa*I 3592 (транзиция С на Т в положении 3594), который маркирует предковую мтДНК для гаплогруппы L, присутствовал у 96 % пигмеев, 93 % бушменов и 71 % банту-говорящих жителей Африки, но ни разу не встретился в Европе или Азии. Континент-специфичными оказались и 77 % азиатских мтДНК, которые кластеризуются внутри гаплогруппы М, маркируемой сайтами *Dde*I в положении 10394 и *Alu*I в положении 10397. Установлено, что примерно 90 % всех типов мтДНК, выявленных в различных популяциях европейцев, принадлежат всего семи гаплогруппам. Во-вторых, в основании «дерева» была общая предковая форма, которую стали называть «митохондриальной Евой». Это означает, что все современные женщины произошли не от одной-единственной предшественницы, но скорее от небольшой группы женщин. В-третьих, с учетом скорости мутирования мтДНК общий предок жил не очень давно, примерно 200 тыс. лет назад. В-четвертых, по мнению авторов, эта «Ева» жила в Африке. Основанием для такого заключения является то, что африканская популяция сильнее дивергировала, значит, дольше находилась в занимаемой ею местности. В-пятых, базируясь на степени варьирования в неафриканских популяциях, пришли к заключению, что популяции-основатели покинули Африку несколько больше чем 100 тыс. лет назад.

И наконец, нет доказательств того, что появились новые гаплогруппы мтДНК как в тех популяциях, которые остались в Африке, так и в тех, которые колонизировали другие континенты.

Интересные результаты дает использование мтДНК в выяснении вопросов эволюции человека.

Любопытные данные привели недавно японские авторы, секвенировав весь митохондриальный геном у японца, африканца и четырех

Рисунок 23.5



Общее происхождение мтДНК человека и неандертальца с последующим полным расхождением и дальнейшая эволюция в пределах вида *Homo sapiens* [Paabo, 1999]

человекообразных обезьян, при этом наибольшее сходство было обнаружено между мтДНК японца и европейца. Дивергенция между митохондриальными геномами людей и шимпанзе, ближайшего (5 млн лет назад) к общему предку из человекообразных обезьян, в 10 раз превышала дивергенцию между японцем и европейцем. При этом для калибровки временной шкалы использовали данные палеонтологии, указывающие, что время дивергенции между орангутаном и остальными антропоидами равно 13 млн лет. В итоге оказалось, что возраст единой мтДНК, предковой по отношению к трем главным расам человека современного вида, составляет около 143 тыс. лет, а мтДНК европейца и японца дивергировали от этой предковой мтДНК около 70 тыс. лет назад.

В пользу моногенетической гипотезы говорит и увенчавшаяся успехом попытка секвенировать участок гипервариабельного сегмента мтДНК, выделенной из костных останков европейского неандертальца. Оказалось, что последовательность неандертальца (379 пн) отличалась от последовательности современного европейца 27 точечными заменами, тогда как в выборке из разных популяций современных людей попарные различия в этом интервале составляли не более 8 замен. По данным анализа дивергенции последовательностей, возраст неандертальца был датирован в 555–690 тыс. лет. Характер варьирования последовательностей нуклеотидов в мтДНК неандертальца показывает, что эта ДНК не могла быть предшественницей мтДНК предка современного человека. Поэтому нет оснований считать возможными скрещивания между предками современных людей и неандертальцами (рис. 23.5).

Полагают, что мигрировавшие из Африки предки современных людей попросту вытесни-

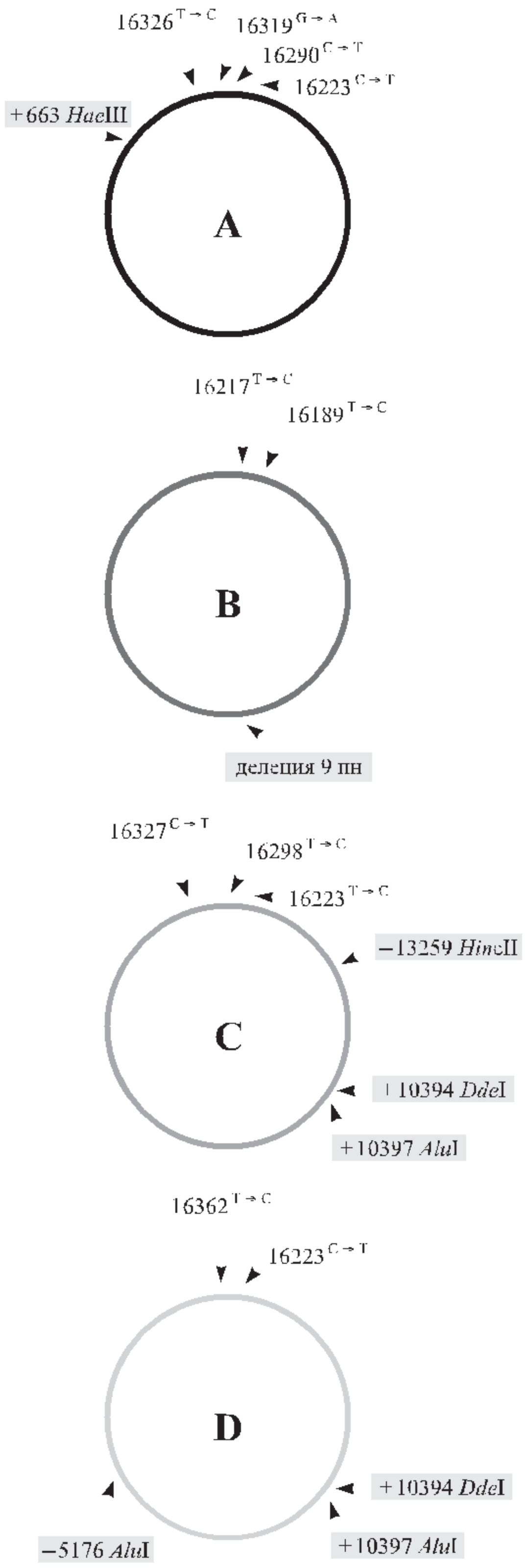
ли неандертальцев, населявших в то время Европу и Азию.

Считается общепринятым, что генетические корни американских индейцев следует искать на территории Северо-Восточной Азии. С использованием данных анализа мтДНК были получены ответы на вопросы о величине, генетическом составе и локализации исходных популяций, так же как и о хронологии, числе и маршрутах миграционных волн и о времени первоначального заселения Нового Света человеком. Коренные жители Северной Америки оказались среди первых популяций, подвергнутых детальному анализу изменчивости мтДНК с целью выяснения истории их происхождения и генетического разнообразия. По результатам высокоразрешающего ПДРФ-анализа (всего митохондриального генома) оказалось, что изменчивость мтДНК американских индейцев ограничена четырьмя группами гаплотипов — A, B, C, D (рис. 23.6), варьирующими по составу и частоте встречаемости в племенах Северной, Центральной и Южной Америки. Каждая из этих четырех гаплогрупп ведет свое начало от одного-двух гаплотипов азиатского происхождения: прямая генеалогическая связь между гаплотипами, аккумулированными в пределах единой материнской мтДНК-гаплогруппы, установлена методом филогенетического анализа. Изменчивость мтДНК, которая накапливалась с момента первоначальной миграции в Новый Свет гаплотипов, основателей A–D гаплогрупп, поддавалась количественной, а значит, и временной оценке.

Предложенная А. Торрони [Torroni et al., 1992] классификация «индейских» гаплогрупп получила широкое распространение. С тех пор отличительным признаком для гаплогруппы A считается появление сайта *Hae*III в нуклеотидной позиции 663 по сравнению с кембриджской последовательностью, для B характерно обнаружение межгенной делеции 9 пн между позициями 8272 и 8289 в сочетании с приобретением сайта *Hae*III/16517, для C — утрата сайта *Hinc*II/13259 и появление сайтов *Alu*I/13262, *Alu*I/10397 и *Dde*I/10394; для D — утрата сайта *Alu*I/5176, но присутствие сайтов *Dde*I/10394 и *Alu*I/10397. В составе гаплогрупп A, C и D сайт *Hae*III/16517 может как присутствовать, так и отсутствовать (см. рис. 23.6). Вскоре выяснилось, что в большинстве случаев каждой гаплогруппе соответствовал определенный мотив (набор мутаций) в первом гипервариабельном сегменте контрольного района.

Лишь недавно в дополнение к четырем основным гаплогруппам Нового Света была иден-

Рисунок 23.6



Диагностические сайты рестрикции/замены в контрольном районе четырех основных индейских гаплогрупп азиатского происхождения [Torroni et al., 1992]

тифицирована пятая, гаплогруппа X, которая содержит уникальную мутацию 16278T.

Таким образом, митохондриальный генофонд коренных жителей Нового Света в основном представлен четырьмя гаплогруппами, которые с низкой частотой встречаются на территории Алтая, Центральной и Восточной Азии [Сукерник и др., 1996].

Особенностью мтДНК коренных народов Сибири является то, что у них не встречаются гаплогруппы B-типа. Все четыре «американские» гаплогруппы встречаются в основном у народов Центрального Китая, тибетцев и монголов. Однако частота совпадения всей «четверки» гаплогрупп невелика, а это делает маловероятным предположение о том, что монголы являются предками индейцев. В 1999 г. группа российских исследователей [Деренко и др., 1999] установила, что суммарная частота гаплогрупп A, B, C, D у тувинцев составляет 72,3 %, у бурят 52,4 % и является наряду с таковой у северных алтайцев (57,2 %) [Сукерник и др., 1996] максимальной среди изученных популяций Азии. Для сравнения, у китайцев — 55 %, монголов — 48 %, а у тибетцев — 37 %. Это позволяет считать популяции, заселяющие территории Южной и Восточной Сибири, предковыми по отношению к этническим группам Нового Света.

Литература к разделу 23.2.2

Деренко М. В., Дамбуева И. К., Малярчук Б. А., Доржу Ч. М., Захаров И. А. Структура и разнообразие митохондриального генофонда коренного населения Тувы и Бурятии по данным о рестрикционном полиморфизме // Генетика. 1999. Т. 35. С. 1706–1712.

Малярчук Б. А. Маркеры митохондриальной ДНК и генетико-демографические процессы в неолите // Генетика. 1998. Т. 34. С. 1009–1012.

Сукерник Р. И., Шур Т. Г., Стариковская Е. Б., Уоллес Д. К. Изменчивость митохондриальных ДНК у коренных жителей Сибири в связи с реконструкцией эволюционной истории американских индейцев. Рестрикционный полиморфизм // Генетика. 1996. Т. 32. С. 432–439.

Cann R. L., Stoneking M., Wilson A. C. Mitochondrial DNA and human evolution // Nature. 1987. Vol. 325. P. 31–36.

Gibbons A. Calibrating the mitochondrial clock // Science. 1998. Vol. 279. P. 28–29.

Merriwether D. A., Clark A. G., Ballinger S. W. et al. The structure of human mitochondrial DNA variation // J. Mol. Evol. 1991. Vol. 33. P. 543–555.

Paabo S. Human evolution // Trends in Genetics. 1999. Vol. 15. P. M13–M16.

Schurr T. G., Sukernik R. I., Starikovskaya Y. B., Wallace D. G. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea-Bering. Sea region during the neolithic // American J. Physic. Anthropol. 1999. Vol. 108. P. 1–39.

Starikovskaya Y. B., Sukernik R. I., Schurr T. G., Kogelnik A. M., Wallace D. C. mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Aucient Beringia and the peopling of the New World // Amer. J. Human Genet. 1998. Vol. 63. P. 1473–1491.

Torroni A., Schurr T. G., Yang C.-C. et al. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations // Genetics. 1992. Vol. 130. P. 153–162.

Wallace D. C. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging // Amer. J. Human Genet. 1995. Vol. 57. P. 201–223.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абелев Г. И. 393, 398, 399, 406, 411
Аврамова З. (Avramova Z.) 186
Агол И. И. 23, 26
Агол В. И. 389
Адамс М. *см.* Adams M.
Айала Ф. *см.* Ayala F.
Айзенк Х. *см.* Isenk H.
Акифьев А. П. (Akif'ev A. P.) 7, 9, 26, 29, 39, 106, 126, 131, 150, 152, 154, 161, 173, 206, 210, 213, 216, 224, 243, 246, 253, 280, 281, 283, 284, 369, 419, 437, 439, 449, 453
Алаторцев В. Е. 297
Александров В. Я. 29, 30
Александров Ю. Н. (Alexandrov Yu. N.) 61, 64
Алексеенко А. А. (Alekseyenko A. A.) 7, 344, 347
Алиханян С. И. 9, 23, 26, 29, 39, 62, 64, 83, 103, 106, 126, 129–131, 150, 152–154, 161, 173, 206, 210, 213, 216, 224, 243, 253, 369, 419, 453
Алтухов Ю. П. 7, 418, 419
Альбертс Б. *см.* Alberts B.
Альвердес Ф. *см.* Alverdes F.
Ананьев Е. В. (Ananiev E. V.) 267, 268
Аравин А. А. 297
Арбер В. *см.* Arber W.
Ардашников С. Н. 26
Аристотель 10
Арриги Ф. *см.* Arrighi F.
Арсеньева М. А. 26
Архипова И. Р. (Arkhipova I. R.) 177
Асланян М. М. 30
Астауров Б. Л. 21, 24, 26, 29, 59, 72, 73, 369–371, 416
Ауэрбах Ш. *см.* Auerbach C.
Ахундова Э. М. 284

Бабков В. В. 29, 438, 439
Балкашина Е. И. 381
Балтимор Д. *см.* Baltimore D.
Бальбиани Э. *см.* Balbiani E.
Банерджи Дж. *см.* Banerji J.
Барр М. *см.* Barr M.
Баталин А. Ф. 54
Батыгин Н. Ф. 27
Баур Э. *см.* Baur E.
Бауэр Х. *см.* Bauer H.
Бах И. С. 437, 449
Бах И. Х. 449
Бах И. А. 449
Бгатов А. В. (Bgatov A. V.) 91
Бебков А. 283
Беерман В. *см.* Beermann W.
Беерман С. *см.* Beermann S.
Бейеринк М. *см.* Beyerink M.
Беккер Х. *см.* Becker H.
Беликов С. (Belikov S.) 340
Беллинг Дж. *см.* Belling J.
Бельговский М. Л. 21, 26, 27
Беляев Д. К. 27–29
Беляев Н. К. 23, 26, 59, 416
Беляева Е. С. (Belyaeva E. S.) 7, 8, 27, 91, 129, 292, 297, 319, 335, 341, 343, 344, 347
Бенасерраф Б. *см.* Benacerraf B.
Бендер В. *см.* Bender W.
Бензер С. *см.* Benzer S.
Бентон У. *см.* Benton W.
Берг П. *см.* Berg P.
Берг Р. Л. 27
Березин Ф. Б. 445
Бернет Ф. М. *см.* Bernet F. M.
Бидл Дж. *см.* Beadle G. W.
Бимс Х. *см.* Beams H.
Битти Б. *см.* Beatty B. R.
Бишоп Дж. М. *см.* Bishop J. M.
Блакберн Е. *см.* Blackburn E. H.
Блаттнер Ф. *см.* Blattner F. R.
Блексли А. Ф. *см.* Blakeslee A. F.
Блобел Г. *см.* Blobel G.
Бляхер Л. Я. 77, 80
Бовери Т. *см.* Boveri T.
Богданов А. А. 277
Богданов Ю. Ф. 313
Бойер Г. *см.* Boyer H. W.
Бойс Р. *см.* Boyce R. P.
Болдырева Л. В. 7
Большаков В. Н. 297
Борлауг Н. Е. *см.* Borlaug N.
Боровских Е. А. 7
Босток К. *см.* Bostock C. J.
Бошьян Г. И. 25
Брайн 24
Браун Д. Д. *см.* Brown D. D.
Браше Ж. 24
Брежнев Д. Д. 54
Брей Д. *см.* Bray D.
Бреннер С. *см.* Brenner S.
Бриггс Р. *см.* Briggs R.
Бриджес К. *см.* Bridges C. B.
Бриттен Р. *см.* Britten R.
Бродский В. Я. 284
Бройер М. *см.* Breuer M.

Бузыканова Г. Н. 50
Булатова Н. Ш. 8
Бэтсон У. *см.* Bateson W.

Вавилов Н. И. (Vavilov N. I.) 20, 21–23, 26, 27, 30, 40, 52–54, 64
Вайнберг Г. *см.* Weinberg G.
Вальдейер В. *см.* Waldeyer W.
Вармус Х. Е. *см.* Varmus H. E.
Васецкий С. Г. 8
Васильев Ю. М. 400, 411
Васильева Л. А. 28, 142
Васин Б. Н. 26
Ватти К. В. 29
Вейсман А. *см.* Weismann A.
Вепринцев Б. Н. 206
Верейская В. Н. 72
Вершинин А. В. 277
Вибэ *см.* Wiebe
Вилли К. *см.* Villee C.
Вилмут Я. *см.* Wilmut I.
Вильсон Э. *см.* Wilson E. B.
Винге О. *см.* Winge O.
Винклер Г. *см.* Winkler G.
Вирхов Р. *см.* Virchow R.
Витковский В. Л. 54
Вишаус Э. *см.* Wieschaus E. F.
Волкова Е. И. (Volkova E. I.) 344, 347
Володин Б. 19
Волотов Е. Н. 47
Воронина Е. Н. (Voronina E. N.) 216
Воронцов Н. Н. 30
Высоцкая Л. В. 30

Гагинская Е. Р. 317
Гайсинович А. Е. 19, 26, 29
Галактионов В. Г. 392, 398
Гамов Г. А. 15, 123
Гвоздев В. А. 7, 17, 138, 141, 173, 180, 191, 297
Геммерлинг Г. *см.* Hämmerling H.
Георгиев Г. П. (Georgiev G. P.) 7, 8, 17, 26, 137, 138, 173, 308, 310, 311, 411, 412
Герасимов И. И. 74
Герасимова Т. И. (Gerasimova T. I.) 187
Гёрдон Дж. *см.* Gurdon J.
Геринг В. *см.* Gehring W.
Гершензон С. М. (Gershenson S. M.) 9, 25, 26, 29, 30, 39, 56, 57, 59–62, 64, 66, 70, 71, 77–82, 85, 91, 126, 173, 208, 210, 312, 313, 351, 370, 371, 416, 419, 423, 424, 426, 453
Гершкович И. *см.* Herskowitz I.
Гершнер А. 10
Гилберт У. *см.* Gilbert W.
Гиппократ 10
Глазер В. М. 235, 284
Глазко В. И. 8, 30
Глазко Т. Т. 8
Глеба Ю. Ю. 204, 206
Глембоцкий Я. Л. 26, 28, 419
Глотов Н. В. 413, 419
Говард-Флендерс П. *см.* Howard-Flanders P.
Говоров Л. И. 27
Голл Дж. *см.* Gall J. G.
Головнин А. (Golovnin A.) 187
Голтон Ф. *см.* Galton F.
Голубовская И. Н. 27, 28
Голубовский М. Д. 27–29, 142, 148
Гольдшмидт Р. *см.* Goldschmidt R. B.
Гончаров Н. П. 7, 74
Горбачев М. С. 25
Гордадзе П. Р. (Gordadze P. R.) 360, 361, 363
Гордон Дж. *см.* Gordon J.
Горощенко Ю. Л. 27, 439
Горчаков А. А. 7
Гранин Д. 29
Гранштейн М. *см.* Grunstein M.
Графодатский А. С. 8, 93, 252
Грачев М. А. 7, 429
Грачева Е. (Gracheva E.) 187
Грейдер С. *см.* Greider C. W.
Гримм Э. Д. 27
Грин К. *см.* Green K.
Грин М. *см.* Green M. M.
Гриффитс Ф. *см.* Griffith F.
Гришанин А. К. (Grishanin A. K.) 280, 283, 284
Груздев А. Д. 28
Губенко И. С. 27, 28, 320
Гудман М. *см.* Goodman M.
Гудспид Т. *см.* Goodspeed T.

Давид И. *см.* Dawid I. B.
Даль В. И. 437
Дамбуева И. К. 458
Данилевская О. Н. (Danilevskaya O. N.) 277
Дарвин Ч. *см.* Darwin C.
Дарлингтон С. *см.* Darlington C.
Дарнелл Дж. *см.* Darnell J.
Дворкин Г. А. 26
де Фриз Г. *см.* de Vries H.
Дегтярев С. В. 284
Дейнеко Е. В. 161
Делоне Л. Н. 63, 283
Дельбрюк М. *см.* Delbrück M.
Демаков С. А. 93
Демакова О. В. 7, 300
Демерек М. *см.* Demerec M.
Деренко М. В. 458
Джадд Б. *см.* Judd B. H.
Джелинек У. *см.* Jelinek W.
Дженик Дж. *см.* Janick J. L.
Дженсен А. *см.* Jansen A.
Джерас Л. *см.* Juras L.
Джинкс Дж. *см.* Jinks J. L.
Джонс Д. *см.* Jones D. F.
Дианов Г. Л. (Dianov G. L.) 216
Диканский Н. С. 7
Добрецов Н. Л. 7
Добржанский Ф. Г. (Dobzhansky Th. G.) 18–21, 25, 27, 29, 40, 66, 82, 258, 323, 348, 416, 417, 419
Докинз Р. *см.* Dokins R.
Долбак Е. А. 7, 8
Донкастер Л. *см.* Doncaster L.
Доржу Ч. М. 458
Доссе Ж. *см.* Dausset J.
Драгавцев В. А. 28
Древич В. Ф. 30

Дубинин Н. П. (Dubinin N. P.) 9, 13, 19, 21, 23–30, 39, 63, 64, 66, 70, 77, 80, 82, 146–148, 251, 253, 289, 290, 297, 299, 300, 301, 348, 350, 351, 352, 353, 415, 416, 418–420, 425, 426, 439, 453
Дубинина Л. Г. 26, 29
Дэвидсон Э. *см.* Davidson E. H.
Дэйвис Б. *см.* Davis B. D.
Дейвис Р. *см.* Davis R. W.
Дэнн Л. *см.* Dunn L. C.
Дюльбекко Р. *см.* Dulbecco R.
Дюрие У. *см.* Durie W.

Евгеньев М. Б. 339
Елисафенко Е. А. (Elisaphenko E. A.) 253
Ельцин Б. Н. 26
Енкен В. Б. 27

Жакоб Ф. *см.* Jacob F.
Жебрак А. Е. 23
Живаго П. И. 26
Жимулёв И. Ф. (Zhimulev I. F.) 29, 30, 90, 91, 129, 131, 172, 179, 180, 185, 190, 191, 194, 195, 198–200, 255–261, 263–267, 271, 273, 277, 279, 281, 282, 284, 288, 292, 295–297, 300, 301, 308, 311–313, 318–321, 323, 324, 326–337, 339–344, 347, 348, 383, 434
Жуковский П. М. 23, 73, 77
Жученко А. А. 50

Завадовский М. М. 23, 26
Закиян С. М. 7, 8, 365, 366
Замбрыски П. *см.* Zambryski P.
Захаров И. А. 8, 27, 29, 89, 91, 458
Захаров И. К. 30
Зеленин А. В. 206
Зелены Ч. *см.* Zeleny C.
Зильбер Л. А. 402, 411
Зиндер Н. *см.* Zinder N.
Зуйтин А. И. 27

Иванов В. И. 8, 29
Иванов П. Л. (Ivanov P. L.) 168, 455
Игамбердиев А. У. 243
Ильина Т. С. 62, 64
Ильинская Н. Б. 326
Инге-Вечтомов С. Г. 7, 9, 27, 29, 30, 50, 51, 64, 70, 75, 77, 80, 91, 106, 126, 148, 224, 234, 253, 398, 419, 426, 430, 438, 439, 451–454
Иогансен В. *см.* Johannsen W. 12, 32, 416
Ист Е. *см.* East E. M.
Итакура К. *см.* Itakura K.

Кайгер Дж. *см.* Kiger J.
Кайгородова И. А. 429
Кайданов Л. З. 27, 30, 70, 419
Кале В. *см.* Kahle W.
Камерер П. *см.* Kamerrer P.
Канаев И. И. 82, 447, 449, 451
Карамышева Т. В. 250, 251, 253
Карбон Дж. *см.* Carbon J.
Карлсон П. *см.* Karlson P.
Карпеченко Г. Д. (Karpechenko G. D.) 21, 23, 27, 72, 73, 77
Картель Н. А. 9
Касперссон Т. *см.* Caspersson T.
Кастл 88
Кауфман Б. *см.* Kaufmann B. P.
Квитко К. В. 27
Кельнер А. 217
Кеннеди Дж. *см.* Kennedy J.
Керкис Ю. Я. 27, 29, 63, 64
Кикнадзе И. И. 28, 29, 319
Кинг Р. Ч. *см.* King R. C.
Кинг Т. Дж. *см.* King T. J.
Кинли Дж. *см.* Kinley J.
Кирпичников В. С. 25
Киселев С. Л. (Kiselev S. L.) 412
Клайнфельтер Х. Ф. *см.* Klinefelter H. F., Jr
Клаусен Дж. *см.* Clausen J.
Клевер У. *см.* Clever U.
Клёнов Х. *см.* Klenow H.
Кливер Дж. *см.* Cleaver J. E.
Клуг А. *см.* Klug A.
Клэйтон Р. *см.* Clayton R. A.
Ковалев И. Ф. 217
Кожевников Б. Ф. 26
Кокоза Е. Б. (Kokoza E. B.) 7, 216
Колесник Н. Н. 27
Колесникова Т. Д. 7
Коллер П. *см.* Koller P.
Колпаков В. Г. 7, 8, 436, 442
Кольцов Н. К. 13, 20–23, 26, 27, 30, 61, 107, 123, 236, 288, 318, 319, 322, 438
Конашев М. Б. 439
Конопка Р. Дж. *см.* Konopka R. J.
Константинов Ю. М. 7
Корнберг А. *см.* Kornberg A.
Корнберг Р. Д. *см.* Kornberg R. D.
Корогодин В. И. 30
Король А. Б. 50
Корочкин Л. И. 7, 8, 28, 284, 357, 369, 370, 371, 373, 379, 383, 389, 436
Корренс К. *см.* Correns C.
Коряков Д. Е. (Koryakov D. E.) 7, 8, 342, 343, 344
Косиков К. В. 47
Костерин О. Э. 7, 442
Костов Д. *см.* Kostoff D.
Коэн С. *см.* Cohen S. N.
Крейтон Г. *см.* Creighton H. B.
Крик Ф. *см.* Crick F. H. C.
Кроу Дж. *см.* Crow J.
Крылов А. Н. 437
Кузин Б. А. 8
Кулаев И. С. 112, 123
Кулаева О. Н. 64, 339
Курода М. *см.* Kuroda M. I.
Курчатов И. В. 25–27
Кушев В. В. 50, 88, 89, 91, 234
Кэймин Л. *см.* Kamin L.
Кэллан Х. *см.* Callan H. G.
Кэнн Р. *см.* Kann R.
Кэрриер У. Л. *см.* Carrier W. L.
Кэтчсайд Д. *см.* Catcheside D. G.

Лаврентьев М. А. 25, 27, 28
Лавровский В. А. 7

Лайон М. *см.* Lyon M.
Ламарк Ж. Б. *см.* Lamarck J. B. de Monet
Ларионов Д. 73
Лассан Т. К. 54
Лебедева Л. И. 63, 64
Левин А. В. 339
Левин М. Л. 22, 23
Левит С. Г. 22, 23, 26
Левитский Г. А. 21, 23, 27, 244, 245, 253
Левонтин Р. *см.* Lewontin R. C.
Ледерберг Дж. *см.* Lederberg J.
Ледерберг Э. *см.* Lederberg A.
Лежен Ж. *см.* Lejeune J.
Лейнсфилд Д. *см.* Lancefield D.
Леммли У. *см.* Laemmli U. K.
Лепезант Ж.-А. *см.* Lepesant J.-A.
Лепешинская О. Б. 25
Лепин Т. К. 27
Лещинская И. Б. 206
Лима-де-Фариа А. *см.* Lima-de-Faria A.
Лобашев М. Е. 9, 21, 23–25, 27, 29–31, 33–36, 39, 46, 48, 50, 52, 61, 64, 70, 76, 77, 80, 83, 91, 106, 148, 253, 351, 370, 419, 426, 454
Лозовская Е. Р. 339
Локк Дж. *см.* Locke J.
Лопашов Г. В. 18, 371, 372, 373
Луканидин Е. М. (Lukanidin E. M.) 412
Лус Я. Я. 27
Лутков А. Н. 27, 72
Лутова Л. А. 161, 206
Лысенко Т. Д. 22, 23, 24, 25, 28, 30, 79
Львов А. *см.* Lwoff A.
Льюин Б. *см.* Lewin B.
Льюис Дж. *см.* Lewis J.
Льюис Э. *см.* Lewis E. B.
Любищев А. А. 25
Люка П. 10
Ляпунов М. В. 437
Ляпунов А. М. 437
Ляпунов Б. М. 437
Ляпунов С. М. 437

Мазин А. В. (Mazin A. V.) 216
Майстренко О. И. 74, 91, 92
Макаров П. В. 25
Макгрегор Х. *см.* Macgregor H. C.
Македонов Г. П. 26
Макеева Е. Н. 9
МакКарти М. *см.* McCarty M.
Маккензен О. *см.* Mackensen O.
МакКлинток Б. *см.* McClintock B.
МакКьюсик В. *см.* McKusick V. A.
МакЛеод К. *см.* McLeod C.
МакФадден Е. *см.* McFadden E. S.
Максам А. *см.* Maxam A.
Малецкий С. И. 28
Мальцева Н. И. 297
Малярчук Б. А. 458
Маниатис Т. *см.* Maniatis T.
Маркерт К. *см.* Markert K. L.
Маррей К. *см.* Murray K.
Маррей Н. *см.* Murray N.
Мартынова Р. П. 26, 27
Медавар П. Б. *см.* Medawar P. B.
Медведев Ж. А. 24, 25, 30, 319
Медведев Н. Н. 27
Медник С. А. (Mednick S. A.) 450, 451
Мезелсон М. *см.* Meselson M.
Мезенко А. М. 9
Мейстер Г. К. 23
Мёллер Г. *см.* Muller H. J.
Мендель Г. И. *см.* Mendel G. I.
Мензбир М. А. 288
Меррей Ч. *см.* Murray C.
Мерц Т. *см.* Merz T.
Метц Ч. *см.* Metz C. W.
Мехельке Ф. *см.* Mechelke F.
Миллер О. *см.* Miller O.
Мирошников М. П. 445
Мирюта Ю. П. 27, 426
Митин М. Б. 21, 23
Михайлов А. Т. 436
Михаэлис А. *см.* Michaelis A.
Мичурин И. В. 22
Моно Ж. *см.* Monod J.
Мор О. *см.* Mohr O.
Морган Л. В. *см.* Morgan L. V.
Морган Т. *см.* Morgan T. H.
Морфи Дж. *см.* Murphy G.
Морфи К. *см.* Murphy C.
Московченко Н. Я. 30
Мотульский А. *см.* Motulsky A. G.
Мошкин Ю. М. (Moshkin Yu. M.) 347
Музрукова Е. Б. 30
Мур *см.* Moore
Муравьева Е. (Muravyova E.) 187
Мэнди Г. *см.* Mandy G.
Мюллер К. *см.* Muller C.
Мюллис К. *см.* Mullis K.
Мюнтцинг А. *см.* Müntzing A.

Навашин С. Г. 20, 244, 245
Надеин В. 448
Надсон Г. А. 13, 17, 21, 60, 64
Назаров В. И. 30
Назарова Н. К. 7
Найт Т. 10
Натали В. Ф. 9
Натанс Д. *см.* Nathans D.
Небел Б. *см.* Nebel B.
Нево Э. *см.* Nevo E.
Немчинов В. С. 23
Нестерова Т. Б. 365, 366
Никитин В. А. 206
Николаева А. Г. 73, 77
Николаенко Е. И. 54
Николай II 95, 168, 206, 454, 455
Никоро З. С. 24, 27
Нильсон-Эле Г. *см.* Nilsson Ehle H.
Ниренберг М. *см.* Nirenberg M. B.
Новицкий Ю. *см.* Novitsky E.
Нодэн Ш. 10
Нолль М. *см.* Nöll M.
Нэгели К. *см.* Nägele C.
Ньютон У. С. Ф. *см.* Newton W. C. F.
Нюссляйн-Волхард К. *см.* Nüsslein-Volhard C.

Овертон А. *см.* Overton A.
Овчинников Л. П. 173, 174
Овчинникова Л. П. (Ovchinnikova L. P.) 216
Оказаки Р. Т. *см.* Okazaki R. T.
Олинс А. *см.* Olins A. L.
Олинс Д. *см.* Olins D. E.
Оловников А. М. (Olovnikov A. M.) 8, 269, 270, 277
Оно С. *см.* Ohno S.
Опарин А. И. 25
Осипов Ю. С. 7
Очоа С. *см.* Ochoa S.

Паван К. *см.* Pavan C.
Пайнтер Т. *см.* Painter T. S.
Пак Ю. А. 7
Паншин И. Б. 290
Пардью М. Л. *см.* Pardue M. L.
Патрушев Л. И. 180
Паттерсон Дж. *см.* Patterson J. T.
Переслени А. И. (Peresleni A. I.) 434
Першина Л. А. 7, 157, 158, 161, 206, 373
Петров Д. А. (Petrov D. A.) 131
Петров Д. Ф. 27
Петров Р. В. 7
Платон 437
Пло Х. *см.* Plough H.
Плохинский Н. А. 27
Полани П. *см.* Polani P.
Полсон Д. *см.* Poulson D. F.
Полынин В. 30
Поляков И. А. 23
Полянский Ю. И. 25
Пономаренко В. В. 29
Попова Н. А. 398
Портер Р. Р. *см.* Porter R. R. 392
Похмельных Г. А. 267
Похолкова Г. В. (Pokholkova G. V.) 91
Презент И. И. 22, 24
Пренан 24
Прескотт Д. М. *см.* Prescott D. M.
Прибнов Д. *см.* Pribnow D.
Прозоров А. А. 123, 238, 243
Прокофьева-Бельговская А. А. 21, 23, 24, 26, 28, 47, 77, 236, 245, 246, 253, 257, 258, 268, 285, 287, 288, 313, 341, 344, 366
Пузырев В. П. 247, 253
Пшеничникова Т. А. 8
Пэйн Ф. *см.* Payne F.
Пэннет Р. *см.* Punnet R.

Радман М. 224
Раджабли Е. П. 27
Раджабли С. И. 28, 247, 283, 284
Разин С. В. (Razin S. V.) 310, 311
Райн Ф. *см.* Ryan F. J.
Райт С. *см.* Wright S.
Рамбоусек Ф. *см.* Rambousek F.
Рапопорт И. А. 21, 23, 24, 25, 26, 27, 61, 62
Раскони С. *см.* Rusconi S.
Ратнер В. А. 7, 20, 28, 29, 30, 64, 108, 123, 125, 126, 128, 129, 131, 142, 150, 151, 428–430
Раус П. *см.* Rous P.
Раушенбах Ю. О. 27
Резник С. 30
Рекославская Н. И. 203
Ригер Р. *см.* Rieger R.
Ритосса Ф. *см.* Ritossa F.
Ричардс Дж. *см.* Richards G.
Робертс К. *см.* Roberts K.
Робертс П. *см.* Roberts P.
Робертс Р. Дж. *см.* Roberts R. J.
Робертсон У. *см.* Robertson W.
Робсон Дж. *см.* Robson J. M.
Родионов А. В. 317
Рожанец Р. В. 445
Ройт А. *см.* Roitt I.
Рокитянский Я. Г. 30
Рокицкий П. Ф. 21, 22, 26, 29, 39, 416
Романов Георгий (Romanov Georgij) 454, 455
Романов И. Д. 27
Ромашов Д. Д. 26, 59, 415, 416, 418, 419
Роскин Г. И. 26
Ру В. *см.* Roux W.
Рубин Дж. *см.* Rubin G.
Рубцов Н. Б. 250, 251, 253, 349
Рыбин В. А. 74
Рэфф М. *см.* Raff M.

Саблина О. В. 247
Савватеева Е. В. (Savvateeva E. V.) 434
Сажрэ О. 10
Саики Р. *см.* Saiki R.
Сакамура Т. *см.* Sakamura T.
Сакс Н. *см.* Sax N.
Салганик Р. И. (Salganik R. I.) 28, 216
Саляев Р. К. 7, 8, 202, 203
Самнер Э. *см.* Sumner A. T.
Сапегин А. А. 63
Саузерн Е. *см.* Southern E.
Сахаров В. В. 21, 26, 61
Свердлов Е. Д. 7, 206
Свиридова Т. А. 206
Селиванова И. П. 7
Семешин В. Ф. (Semeshin V. F.) 91, 93, 319, 329, 330, 347
Сен-Симон А. 449
Серебровский А. С. 13, 15, 21, 22, 26, 27, 29, 83, 91, 146–148, 416, 438
Сетлоу Р. *см.* Setlow R. B.
Сеченов И. М. 437
Сидоров Б. Н. (Sidorov B. N.) 21, 26, 28, 289, 290, 297, 299–301
Сингер М. *см.* Singer M.
Синнот Э. *см.* Sinnot E. W.
Сирс Е. *см.* Sears E.
Скадовский С. Н. 26
Слизинска Х. *см.* Slizynska H.
Смирнов В. Г. 27, 70, 234
Смирнов А. Ф. 351, 357, 359, 366
Смирнов Ф. А. 27, 61
Смит Х. *см.* Smith H.
Снелл Дж. *см.* Snell G.
Сойфер В. Н. 128, 129, 131, 222–225, 384, 385
Соколов В. А. 7, 426
Соколов Н. Н. 26, 28, 66, 285, 301, 348,
Соколова К. Б. 370

Соловей И. В. (Solovei I.) 317
Сорокин В. В. 8
Спивак И. М. 224
Спигелмэн С. *см.* Spiegelman S.
Спирер П. *см.* Spierer P.
Спрадлинг А. *см.* Spradling A.
Стакан Г. А. 27
Сталин И. В. 23, 24
Сталь Ф. *см.* Stahl W. W.
Стандифорд Д. 281
Стариковская Е. Б. (Starikovskaya Y. B.) 458
Стегний В. Н. 77
Стёртевант А. *см.* Sturtevant A.
Страсбургер Э. *см.* Strasburger E. H.
Струнников В. А. 25, 425, 426
Сукачев В. Н. 25
Сукерник Р. И. (Sukernik R. I.) 458
Соунсон К. *см.* Swanson C. P.
Суриков И. М. 27
Сэджер Р. *см.* Sager R.
Сэмбрук Дж. *см.* Sambruck J.
Сэнгер Ф. *см.* Sanger F.
Сэттон У. *см.* Sutton W.

Таранин А. В. 7
Тарасов В. А. 26
Тартоф К. *см.* Tartof K.
Таусон Е. Л. 158
Тахтаджян А. Л. 25
Тейлор У. Р. *см.* Taylor W. R.
Тейтум Э. *см.* Tatum E.
Темин Х. *см.* Temin H.
Тернер Х. Х. *см.* Turner H. H.
Тессье А. 24
Тимирязев К. А. 22
Тимофеев-Ресовский Н. В. 13, 21, 25, 28–30, 62, 413, 419
Тиняков Г. Г. 26, 66, 301, 348
Тихомирова М. М. 29, 91, 92, 94, 95
Тихонов А. (Tikhonov A.) 186
Тодд А. *см.* Todd A.
Тонегава С. *см.* Tonegava S.
Торрони А. *см.* Torroni A.
Трофимов И. Е. 26
Тульчинский Е. М. (Tulchinsky E. M.) 412

Уилкинс М. *см.* Wilkins M. H. F.
Уилсон Р. *см.* Wilson R. K.
Уоллес Д. К. *см.* Wallace D. C.
Уотсон Дж. *см.* Watson J. D.
Уршпрунг Г. *см.* Ursprung H.
Уэбер Дж. *см.* Weber J.
Уэйнстайн А. *см.* Weinstein A.

Фаворова О. О. 123, 206, 399
Фадеева Т. С. 29
Феркерк А. *см.* Verkerk A. J.
Ферри Л. В. 26
Филатенко А. А. 54
Филиппов Г. С. 13, 21, 60, 64
Филипченко Ю. А. 21, 22, 27, 64, 437–439
Финчем Дж. *см.* Fincham J. R. S. 85, 91
Фишер Р. *см.* Fisher R. A.
Фишер С. *см.* Fisher S.
Флемминг В. *см.* Flemming W.
Флоринский В. М. 423, 424, 426
Фляксбергер К. А. 73
Фогель Ф. *см.* Fogel G.
Фохт О. *см.* Vogt O.
Франклин Р. *см.* Franklin R.
Фрич Э. *см.* Frich E.
Фролова С. Л. 26

Хадорн Э. *см.* Hadorn E.
Хайнц Вилли *см.* Heinz Willy
Хайнц Вольф *см.* Heinz Wolf
Хайц Э. *см.* Heitz E.
Харди Дж. *см.* Hardy G.
Харланд С. *см.* Harland S.
Хатавэй С. *см.* Hathaway S.
Хвостова В. В. 26, 27, 29, 77, 299, 300, 301
Хейфлик Л. *см.* Hayflick L.
Хелински Д. *см.* Helinsky D.
Хеникофф С. *см.* Henikoff S.
Хенниг В. *см.* Hennig W.
Хесин Р. Б. (Хесин-Лурье Р. Б.) 26, 142, 145, 146, 147, 148
Херши А. Д. *см.* Hershey A. D.
Хлебодарова Т. М. 339
Хогнесс Д. *см.* Hogness D.
Холдейн Дж. *см.* Haldane J. B. S.
Холли Р. *см.* Holley R.
Хорана Г. *см.* Khorana H.
Христолюбова Н. Б. 28
Хрущев Н. С. 28
Хэйес У. *см.* Hayes W.

Циммер К. *см.* Zimmer K.
Цингер В. Я. 288

Чадов Б. Ф. 50
Чайлахян Л. М. 206
Чейз М. *см.* Chase M.
Челышева Л. А. 315, 317
Ченоснова Л. В. 30
Ченцов Ю. С. 309, 310, 311
Чепкасов И. Л. 440, 444, 445
Чермак Э. *см.* Tschermak E.
Чернин Л. С. 9, 39, 106, 126, 131, 150, 152, 154, 161, 173, 206, 210, 213, 216, 224, 243, 253, 369, 419, 453
Черный И. В. 30
Четвериков С. С. (Tshetverikov S. S.) 21, 22, 26, 27, 30, 59, 415–417, 419
Чикова В. А. 54
Чистяков И. Д. 236
Чолаков В. 10, 123
Чубарева Л. А. 27
Чувашина Н. П. 54
Чугуй В. Ф. 7, 442

Шапиро Дж. 283
Шапиро Н. И. 26
Шарма А. *см.* Sharma A.
Шарп Ф. А. *см.* Sharp P. A.
Шварц А. 30

Шварц Ю. Б. (Schwartz Yu. B.) 304
Шевелуха В. С. 123, 206
Шевченко В. А. 26
Шелл Д. *см.* Shell D.
Шерешевский Н. А. 76
Шерудило А. И. 28
Шестаков С. В. 30
Шеффнер С. *см.* Schaffner S.
Шкварников П. К. 25, 27, 30
Шлома В. В. 93
Шмакова М. А. 7, 8
Шмальгаузен И. И. 23
Шнедл У. *см.* Schnedl W.
Шноль С. Э. 30, 64
Шо К. *см.* Shaw C.
Шрёдингер Э. *см.* Schrödinger E.
Шрэдер Ф. *см.* Schrader F.
Штерн К. *см.* Stern C.
Шу Т. *см.* Hsu T.
Шульц А. *см.* Schulz A.
Шульц Дж. *см.* Schultz J.
Шумный В. К. 7, 8, 28, 29, 30, 77
Шур Т. Г. *см.* Schurr T. G.

Щапова А. И. 277
Щелкунов С. Н. 398, 399
Щербаков Ю. Н. 54
Щербаков Д. Ю. 429

Эдельман Дж. М. *см.* Edelman G. M.
Эйвери А. Дж. *см.* Avery A. G.
Эйвери О. *см.* Avery O. T.
Эленс А. *см.* Alens A.
Элленгорн Я. Е. 313
Энгельгардт В. А. 27
Энгельс Ф. 24
Эрхард Х. *см.* Erhard H.
Эфроимсон В. П. 29, 451
Эфрусси Б. *см.* Ephrussi B.
Эшбернер М. *см.* Ashburner M.

Юдин А. Л. 27
Юдин П. Ф. 21
Юрке А. 438
Юрченко Н. Н. 142

Яблоков А. В. 413, 419
Яковлева М. А. 54
Янг У. *см.* Young W. J.
Янковский Н. К. 27, 168, 205, 206
Яновский Ч. *см.* Yanofsky C.
Ячевская Г. Л. 74, 77

Aalfs J. D. 308
Adams M. (Адамс М.) 17, 128
Akif'ev A. P. *см.* Акифьев А. П.
Alberts B. (Альбертс Б.) 10, 123, 180, 183, 185, 206, 227–230, 233–235, 297, 298, 303, 308, 398, 401, 403–405, 407, 408, 411
Alekseyenko A. A. *см.* Алексеенко А. А.
Alens A. (Эленс А.) 24, 30
Alexandrov Yu. N. *см.* Александров Ю. Н.
Allen G. E. 20, 40, 50, 353, 354
Allmen G. 385, 387
Alverdes F. (Альвердес Ф.) 330
Ammermann D. 281
Ananiev E. V. *см.* Ананьев Е. В.
Ancelin K. 277
Anderson 245
Anderson W. W. 70
Andersson L. 253
Antonarakis S. E. 206
Arber W. (Арбер В.) 153
Arkhipova I. R. *см.* Архипова И. Р.
Arnold J. 70
Arrighi F. (Арриги Ф.) 249
Ashburner M. (Эшбернер М.) 7, 49, 50, 64, 70, 90, 91, 125, 126, 128, 136, 138, 142, 172, 194, 196, 234, 319, 333–335, 338, 339, 352, 354
Atherton D. D. 259
Auerbach C. (Ауэрбах Ш.) 61, 62, 64
Avery A. G. (Эйвери А. Дж.) 74
Avery O. T. (Эйвери О.) 14, 96
Avner P. 366
Avramova Z. *см.* Аврамова З.
Ayala F. (Айала Ф.) 9, 50, 70, 75, 77, 95, 253, 419, 421, 422, 426

Baimai V. 258
Baker B. S. 308
Balbiani E. (Бальбиани Э.) 236, 311, 318, 323, 330, 331, 340, 342
Baldwin D. J. 70
Ballinger S. W. 458
Baltimore D. (Балтимор Д.) 407
Baker B. S. 362, 363
Banerji J. (Банерджи Дж.) 182
Barinaga M. 434, 436
Barker M. 417
Barnes N. S. 151
Barnett L. 126
Barr M. (Барр М.) 363, 366
Barrell B. C. 243
Bashaw G. J. 362, 363
Bassett D. E. Jr. 128
Bateson W. (Бэтсон У.) 12, 21, 32, 42, 146, 381
Bauer H. (Бауэр Х.) 312, 318, 323
Baur E. (Баур Э.) 21, 452
Bazin C. 142
Beadle G. W. (Бидл Дж.) 13, 16, 19, 148
Beams H. (Бимс Х.) 318
Beatty B. R. (Битти Б.) 341
Becker H. J. (Беккер Х.) 330, 332, 333
Beermann S. (Беерман С.) 320, 340
Beermann W. (Беерман В.) 319, 325, 326, 330, 331
Belikov S. *см.* Беликов С.
Bell A. C. 186
Bellen H. J. 172, 185
Belling J. (Беллинг Дж.) 313
Belote J. M. 355, 357
Belyaeva E. S. *см.* Беляева Е. С.
Benacerraf B. (Бенасерраф Б.) 397
Bender W. (Бендер В.) 16, 166
Benton W. (Бентон У.) 15
Benzer S. (Бензер С.) 148, 210, 434
Berendes H. D. 319

Berezney R. 123, 311
Berg P. (Берг П.) 9, 125, 127, 128, 152, 234, 394, 398
Bernet F. M. (Бернет Ф. М.) 396
Besnard A. 18
Bevan M. 128
Beukeboom L. W. 288
Beyerink M. (Бейеринк М.) 73
Bgatov A. V. *см.* Бгатов А. В.
Bickmore W. A. 249, 253
Bier E. 185
Biessmann H. 271, 298
Birnstiel M. L. 206
Birren B. 161
Bishop J. M. (Бишоп Дж. М.) 407
Blackburn E. H. (Блакберн Е.) 271, 272, 274, 276, 277
Blakeslee A. F. (Блексли А.) 74
Blattner F. R. (Блаттнер Ф.) 17, 125, 126, 128, 129, 131, 150, 151, 243
Blobel G. (Блобел Г.) 311
Bloch C. 126, 128, 131, 151, 243
Blumenthal A. B. 119, 123
Bodnar A. G. 276, 277
Boguski M. S. 128
Bonner J. 338, 339
Borlaug N. E. (Борлауг Н. Е.) 63
Bostock C. J. (Босток К.) 236, 253
Boveri T. (Бовери Т.) 12, 278, 279
Bouchard T. J. , Jr. 439, 441, 445
Boyce R. P. (Бойс Р.) 219
Boyer H. W. (Бойер Г.) 152, 153
Brand A. H. 172, 184, 185
Bray D. (Брей Д.) 10, 123, 180, 185, 206, 234, 235, 297, 298, 308, 398, 411
Brenner S. (Бреннер С.) 15, 126, 151, 384
Breuer M. (Бройер М.) 330, 341
Bridges C. B. (Бриджес К.) 12, 14, 21, 66, 67, 69, 74, 236, 262, 324, 325, 330, 352–354, 381
Briggs R. (Бриггс Р.) 371
Britten R. (Бриттен Р.) 129
Brown D. D. (Браун Д. Д.) 341
Brun C. 277
Brutlag D. L. 261
Bukau B. 339
Bussey H. 243
Byrd K. 187

Cai H. N. 186
Campbell K. H. S. 373
Callaerts P. 172, 185, 387
Callan H. G. (Кэллан Х.) 119, 123, 313–317
Campuzano S. 182, 185
Cann R. L. 458
Cannon G. B. 342
Capy P. 135, 142
Carbon J. (Карбон Дж.) 119
Carpenter A. T. C. 234
Carrier W. L. (Кэрриер У. Л.) 219
Carthew R. W. 194
Caspari E. 454
Caspersson T. (Касперссон Т.) 246
Catcheside D. G. (Кэтчсайд Д.) 85
Celniker S. 128
Chase M. (Чейз М.) 14, 107
Chan C. S. M. 273
Chowdhary B. P. 252, 253
Clark A. G. 458
Clark M. S. 128
Clausen J. (Клаусен Дж.) 72, 73
Clayton R. A. (Клэйтон Р.) 17, 128, 129, 131, 243
Cleaver J. E. (Кливер Дж.) 224.
Clever U. (Клевер У.) 333
Cline T. W. 357, 359
Clonninger C. R. 451
Cohen S. N. (Коэн С.) 153
Cooley L. 142
Corces V. G. 187
Corcos A. F. 18–20
Correns C. (Корренс К.) 11, 19, 146, 452
Craig J. M. 249, 253
Creighton H. B. (Крейтон Г.) 45
Crick F. H. C. (Крик Ф.) 14, 15, 19, 80, 108–110, 123, 126, 384
Crow J. (Кроу Дж.) 425
Crow J. F. 20
Cryderman D. C. 298
Curtis H. 151

Danilevskaya O. N. *см.* Данилевская О. Н.
Darlington C. D. (Дарлингтон С.) 21, 319
Darnell J. (Дарнелл Дж.) 15
Darwin C. (Дарвин Ч.) 10, 22, 79, 415, 416, 417
Dausset J. (Доссе Ж.) 397
Davidson E. H. (Дэвидсон Э.) 129
Davis B. D. (Дэйвис Б.) 102
Davis R. W. (Дейвис Р.) 15, 119
Davis R. L. 195
Dauwalder B. 195
Dawid I. B. (Давид И.) 341
Delbrück M. (Дельбрюк М.) 13, 217
Demerec M. (Демерек М.) 62
DePamphilis M. L. 120, 121, 122, 123
DeRobertis E. 386, 387
Devor E. J. 451
de Vries H. (де Фриз Г.) 11, 31, 34, 51, 416
Deutsch M. 188, 189
Dianov G. L. см. Дианов Г. Л.
DiBello P. R. 190
Dickman S. 30, 64
Dimitri P. 131, 261, 268, 344
Dobzhansky Th. G. *см.* Добржанский Ф. Г.
Dokins R. (Докинз Р.) 123
Doncaster L. (Донкастер Л.) 12
Doshi P. 263
Drouin R. 123
Dübendorfer A. 356, 357
Dubey D. D. 123
Dubinin N. P. *см.* Дубинин Н. П.
Dulbecco R. (Дюльбекко Р.) 217, 407
Dunn L. C. (Дэнн Л.) 21, 39, 40, 50, 82
Durie W. (Дюрие У.) 312, 314
Duthie S. M. 253

East E. M. (Ист Е.) 38, 425
Edgar R. S. 10, 82, 370, 371, 451
Eisenberg I. F. 253
Edelman G. M. (Эдельман Дж. М.) 392

Elgin S. C. R. 180, 308
Elisaphenko E. A. *см.* Елисафенко Е. А.
Emerson R. A. 38
Engels W. R. 142
Ephrussi B. (Эфрусси Б.) 21, 301
Erhard H. (Эрхард Х.) 330

Faccio Dolfini S. 255
Falk D. 64
Falk R. 20
Federoff N. V. 20, 131, 142
Felsenfeld G. 186
Ferguson-Smith M. A. 250, 251
Ferl R. J. 430
Fetni R. 123
Fincham J. R. (Финчем Дж.) S. 85, 91
Finnegan D. J. 142
Fisher R. A. (Фишер Р.) 18, 19, 415–417
Fisher S. (Фишер С.) 435, 436
Flemming W. (Флемминг В.) 236, 311, 312, 314
Fogel G. (Фогель Ф.) 82
Franklin R. (Франклин Р.) 14
Frich E. (Фрич Э.) 165
Frolkis M. 277
Frönicke L. 253

Gabrielli W. F. Jr. 451
Gall J. G. (Голл Дж.) 92, 249, 259, 272, 314–317, 341, 343
Galler R. 340
Galton F. (Голтон Ф.) 10, 80, 437, 438
Gatti M. 302, 308
Gehring W. J. (Геринг В.) 7, 17, 172, 181, 183–185, 200, 298, 380, 383–385, 387
Georgiev G. P. *см.* Георгиев Г. П.
Georgopoulos C. 339
Gerasimova T. I. см. Герасимова Т. И.
Gershenson S. M. *см.* Гершензон С. М.
Gibbons A. 430, 458
Gilbert W. (Гилберт У.) 17, 125, 168
Gilson E. 277
Goday C. 278
Goffeau A. 128, 243,
Goldschmidt R. B. (Гольдшмидт Р.) 21, 77, 147
Golic K. G. 231, 232, 234
Golic M. M. 232, 234
Golovnin A. *см.* Головнин А.
Goodman M. (Гудман М.) 430
Goodspeed T. (Гудспид Т.) 72, 73
Goodwin S. F. 434
Gordadze P. R. *см.* Гордадзе П. Р.
Gordon J. (Гордон Дж.) 17, 204
Gottesman I. I. 444, 445
Gracheva E. *см.* Грачева Е.
Granok H. 180, 308
Graveley B. R. 191
Graves J. A. M. 357, 366
Green K. (Грин К.) 147
Green M. M. (Грин М.) 10, 59, 147
Greenspan R. J. 434
Greider C. W. (Грейдер С.) 274, 276, 277
Griffith F. (Гриффитс Ф.) 95
Grigorian M. S. 412
Grishanin A. K. *см.* Гришанин А. К.
Grossniklaus U. 172, 185
Grunstein M. (Гранштейн М.) 16
Gu W. 363
Gurdon J. (Гёрдон Дж) 18, 371–373, 375, 426
Gütherz S. 254

Hackstein J. H. P. 266, 268, 288
Hadorn E. (Хадорн Э.) 374, 375
Haldane J. B. S. (Холдейн Дж.) 24, 46, 88, 89, 415, 416, 417
Halder G. 172, 185, 386, 387
Hall J. C. 434
Hämmerling H. (Геммерлинг Г.) 370
Hanna-Rose W. 178, 180
Hankeln T. H. 199
Hansen U. 178, 180
Hardy G. (Харди Дж.) 413–415, 417, 418
Harland S. (Харланд С.) 21
Harris C. 412
Hart C. M. 187
Hartsoeker 369
Hathaway S. (Хатавэй С.) 441
Hauschtek-Jungen E. 288
Hayes W. (Хэйес У.) 102
Hayflick L. (Хейфлик Л.) 270, 276
Heard E. 366
Hediger M. 356, 357
Heinz Willy (Хайнц Вилли) 449
Heinz Wolf (Хайнц Вольф) 449
Heitz E. (Хайц Э.) 254, 255, 257, 262, 268, 318, 342, 343
Helinsky D. (Хелински Д.) 153
Hellmund D. 339
Henikoff S. (Хеникофф С.) 299, 301, 361, 363
Hennig W. (Хенниг В.) 268, 282, 344
Hershey A. D. (Херши А. Д.) 14, 107, 108
Herskowitz I. (Гершкович И.) 9, 19, 36, 38, 39, 50, 353, 426, 453
Hess O. 266
Hieter P. 128
Higuet D. 142
Hilfiker A. 363
Hilfiker-Kleiner D. 363
Hochman B. 243
Hochstenbach R. 266, 268, 288
Hogness D. S. (Хогнесс Д.) 16, 17, 123, 137, 138, 166
Holley R. (Холли Р.) 15, 124
Hollstein M. 412
Holt R. 128
Hori T. 317
Howard-Franders P. (Говард-Флендерс П.) 219
Hsu T. (Шу Т.) 249
Huberman J. A. 123
Huet F. 331
Hughes-Schrader F. 285
Hunter T. 412
Hutchings B. 451

Isenk H. (Айзенк Х.) 440, 449
Itakura K. (Итакура К.) 152
Ivanov P. L. *см.* Иванов П. Л.

Jackson B. 18
Jacob F. (Жакоб Ф.) 15, 150
Jaenisch R. 366
James T. C. 343
Janick J. (Дженик Дж.) 424
Jansen A. (Дженсен А.) 446
Jelinek W. (Джелинек У.) 15
Jeon K. W. 311
Jinks J. L. (Джинкс Дж.) 453
Jobling M. A. 261, 262, 268
Johannsen W. (Иогансен В.) 12, 32, 416
Jones D. F. (Джонс Д.) 421, 425, 426
Judd B. H. (Джадд Б.) 83, 91
Junakovic N. 131, 261, 268
Juras L. (Джерас Л.) 311

Kahle W. (Кале В.) 282
Kamerrer P. (Камерер П.) 21, 22
Kamin L. (Кэймин Л.) 446
Kann R. (Кэнн Р.) 456
Karim F. D. 190
Karlson P. 333
Karlsson J. L. (Карлсон П.) 451
Karpechenko G. D. *см.* Карпеченко Г. Д.
Kaufman T. C. 64, 91
Kaufmann B. P. (Кауфман Б.) 344
Kelley R. 142
Kelley R. L. 363
Kellum R. 185, 187
Kennedy J. (Кеннеди Дж.) 448
Ketchum K. A. 128, 131, 243
Khorana H. (Хорана Г.) 15, 124, 152
Kiger J. (Кайгер Дж.) 9, 50, 70, 75, 77, 95, 253, 419, 421, 422, 426
Kilbey B. J. 64
Kim U.-J. 161
Kind A. J. 373
King R. C. (Кинг Р. Ч.) 7, 10, 38, 39, 318
King T. J. 371
Kingston R. E. 308
Kinley J. (Кинли Дж.) 441
Kiselev S. L. *см.* Киселев С. Л.
Klein H. L. 234
Klenow H. (Клёнов Х.) 93
Klinefelter H. F., Jr. (Клайнфельтер Х. Ф.) 76, 357
Kloss B. 434
Kloter U. 387
Klug A. (Клуг А.) 302
Kogelnik A. M. 458
Kohler R. E. 20
Kokoza E. B. *см.* Кокоза Е. Б.
Koller P. (Коллер П.) 319
Konopka R. J. (Конопка Р. Дж.) 434
Kornberg A. (Корнберг А.) 19, 110, 112
Kornberg R. D. (Корнберг Р. Д.) 302
Kornberg T. B. 301
Koryakov D. E. *см.* Коряков Д. Е.
Kostoff D. (Костов Д.) 21, 318
Kriegstein H. J. 123
Kuby J. 390, 391, 393, 396, 397, 398
Kuroda M. I. (Курода М.) 360, 361, 363, 366
Kyriacou C. P. 434

Lacroix 315
Laemmli U. K. (Леммли У.) 187, 309
Lai C. 142
Lamarck J. B. de Monet (Ламарк Ж. Б.) 10
Lancefield D. E. (Лейнсфилд Д.) 40, 258
Langin T. 142
Lawrence P. A. 172, 181, 182, 195, 376, 377, 383
Lederberg A. (Ледерберг Э.) 59
Lederberg J. (Ледерберг Дж.) 14, 19, 59, 99, 100
Lee K. 185
Lefevre G. , Jr. 90, 91
Lehmann A. R. 219, 220, 224
Lejeune J. (Лежен Ж.) 75
Lemieux N. 123
Lepesant J.-A. (Лепезант Ж.-А.) 7
Lerner M. 417
Levine A. J. 412
Lewin B. (Льюин Б.) 9, 10, 39, 64, 90, 113, 114, 117, 121, 123, 126, 129, 131, 137, 141, 142, 149–151, 172–176, 178, 180, 187–191, 196, 200, 206, 210, 226–228, 234, 243, 303–306, 308, 311
Lewis E. B. (Льюис Э.) 20, 52, 148, 289, 380, 381, 383
Lewis J. (Льюис Дж.) 10, 123, 180, 185, 206, 234, 235, 297, 298, 308, 398, 411
Lewis M. 337
Lewontin R. (Левонтин Р.) С. 446
Lifton R. P. 199
Lima-de-Faria A. (Лима-де-Фариа А.) 257, 312, 313
Lindquist S. 231, 232, 234
Lindsley D. L. 89, 91, 139, 142
Lis J. T. 179, 180
Locke J. (Локк Дж.) 300, 301
Lohe A. 261
Long M. 188, 189
Loreto E. L. S. 422, 426
Lott M. T. 243
Lowenhaupt K. 277
Lu Q. 179, 180, 308
Lucchesi J. C. 363
Lukanidin E. M. *см.* Луканидин Е. М.
Lwoff A. (Львов А.) 150
Lyon M. (Лайон М.) 363, 364, 366

Maas C. 206
Macgregor H. C. (Макгрегор Х.) 92, 94, 253
Mackensen O. (Маккензен О.) 348
Maine E. 187
Mandel J.-L. 211
Mandy G. (Мэнди Г.) 73
Mangelsdorf P. C. 30
Maniatis T. (Маниатис Т.) 16, 165
Mark M. E. 128
Markert K. L. (Маркерт К.) 370
Marshall C. J. 412
Martini M. 206
Marx J. 120
Mason J. M 271
Maxam A. (Максам А.) 17, 168
Mayer M. P. 339
Mazin A. V. *см.* Мазин А. В.
McCarty M. (МакКарти М.) 14, 96
McCreath K. J. 373

McClintock B. (МакКлинток Б.) 17, 45, 131, 133, 142, 266, 269
McFadden E. S. (МакФадден Е.) 73, 77
McKenzie S. L. 338
McKusick V. A. (МакКьюсик В.) 82, 245, 247, 253, 363, 366
McLeod C. (МакЛеод К.) 14, 96
McWhir J. 373
Mechelke F. (Мехельке Ф.) 330
Medawar P. B. (Медавар П. Б.) 396
Mednick S. A. *см.* Медник С. А.
Meise M. 357
Meller V. H. 363, 366
Mendel G. I. (Мендель Г. И.) 10–12, 18–20, 22, 31–35, 38–40, 59, 381, 415, 417, 420, 452
Meneely P. M. 361, 363
Merriwether D. A. 458
Merz T. (Мерц Т.) 253
Meselson M. (Мезелсон М.) 110, 112
Messier W. 262, 268
Mestril R. D. 180
Metz C. W. (Метц Ч.) 40, 330
Meyer B. J. 357–359, 367
Michaelis A. (Михаэлис А.) 9, 10
Miklos G. L. G. 131
Miller D. D. 256
Miller O. (Миллер О.) 341
Misra S. 128
Miyamoto M. 253
Modolell J. 182, 185
Mohr O. (Мор О.) 40, 353
Mombaerts P. 373
Monaghan F. V. 18, 19, 20
Monod J. (Моно Ж.) 15, 24, 150
Moore (Мур) 18
Morell V. 211
Morgan L. V. (Морган Л. В.) 41
Morgan T. H. (Морган Т.) 12, 19, 22, 40, 42, 43, 45, 46, 59, 60, 88, 146, 148, 236, 353, 369, 370
Morimoto R. I. 339
Morris E. J. 298
Moshkin Yu. M. *см.* Мошкин Ю. М.
Motulsky A. G. (Мотульский А.) 82
Muller C. (Мюллер К.) 244
Muller H. J. (Мёллер Г.) 12, 13, 15, 19, 21, 23, 24, 40, 42, 47, 51, 53, 57, 58, 61, 63, 64, 68, 147, 236, 251, 263, 268, 269, 289, 438
Muller-Navia J. 253
Mullis K. B. (Мюллис К.) 16, 167, 168
Müntzing A. (Мюнтцинг А.) 9, 39, 73, 77, 426, 453, 454
Muravyova E. *см.* Муравьева Е.
Murphy C. (Морфи К.) 317
Murphy G. (Морфи Дж.) 128
Murray C. (Меррей Ч.) 448
Murray K. (Маррей К.) 15
Murray N. E. (Маррей Н.) 15, 206

Nägele C. (Нэгели К.) 18, 19, 77
Nathans D. (Натанс Д.) 153
Nebel B. (Небел Б.) 74
Neumann D. 339
Newman 447
Nevo E. (Нево Э.) 30
Newton W. C. F. (Ньютон У. С. Ф.) 244
Nicklas R. B. 282
Nilsson Ehle H. (Нильсон-Эле Г.) 37
Nirenberg M. B. (Ниренберг М.) 15, 124
Nishida C. 301
Nöll M. (Нолль М.) 302
Nöthiger R. 354, 357
Nover L. 339
Novitski E. (Новицкий Ю.) 64, 252
Nüsslein-Volhard C. (Нюссляйн-Волхард К.) 129, 380

O'Brien S. J. 89, 91, 253
Ochoa S. (Очоа С.) 176
Oemo E. 253
Ohno S. (Оно С.) 363
O'Kane C. J. 172, 185
O'Kane K. 185
Okazaki R. T. (Оказаки Р. Т.) 115, 116, 270, 274
Olins A. L. (Олинс А.) 302
Olins D. E. (Олинс Д.) 302
Oliveira A. K. 426
Oliver G. 387
Olovnikov A. M. *см.* Оловников А. М.
Ozeki H. 242, 243
Orton S. M. 253
Overton A. (Овертон А.) 85
Ovchinnikova L. P. *см.* Овчинникова Л. П.
Ouelette M. 277
Owen R. D. 10, 82, 370, 371, 451

Paabo S. 456, 458
Pace N. 428, 430
Paika I. J. 256
Painter T. S. (Пайнтер Т.) 65, 68, 70, 263, 268, 318, 319, 330, 348
Panning B. 366
Pannuti A. 363
Pardue M. L. (Пардью М. Л.) 92, 93, 94, 249, 276, 277
Patterson J. T. (Паттерсон Дж.) 348
Paulsson G. 340
Pavan C. (Паван К.) 330, 341
Payne F. (Пэйн Ф.) 40
Peacock W. J. 198
Pearson R. K. 172, 185
Peixoto A. A. 434
Peresleni A. I. *см.* Переслени А. И.
Peresleni I. V. 434
Perrimon N. 172, 184, 185
Perry A. C. F. 373
Petrov D. A. *см.* Петров Д. А.
Pfitzner W. 311
Phillips R. L. 268
Pieau C. 351
Pilgrim I. 19, 20
Plough H. (Пло Х.) 40
Plunkett G. 126, 128, 131, 151, 243
Pokholkova G. V. *см.* Похолкова Г. В.
Polani P. (Полани П.) 251
Pongs O. 335
Porter R. R. (Портер Р. Р.) 392
Poulson D. F. (Полсон Д.) 330

Prasher D. C. 172
Prescott D. M. (Прескотт Д. М.) 7, 129, 131, 191, 193, 194, 271, 284
Preston R. 128
Pribnow D. (Прибнов Д.) 175
Price J. L. 434
Pruss D. 308
Punnett R. (Пэннет Р.) 12, 32, 34, 42
Purvis I. J. 253

Quiring R. 387

Raff M. (Рэфф М.) 10, 180, 185, 206, 234, 235, 297, 298, 308, 398, 411
Rambousek F. (Рамбоусек Ф.) 236, 318
Raudsepp T. 253
Razin S. V. *см.* Разин С. В.
Read A. P. 206
Redi C. A. 253
Reuter G. 297
Ribbert D. 321
Richards G. (Ричардс Дж.) 333–336
Richer C.-L. 123
Riddle D. L. 359
Rieger R. (Ригер Р.) 9, 10
Rines H. W. 268
Ritossa F. (Ритосса Ф.) 336, 337, 341
Roberts D. B. 94, 172
Roberts K. (Робертс К.) 10, 180, 185, 206, 234, 235, 297, 298, 308, 398, 411
Roberts P. (Робертс П.) 15
Roberts P. A. 70
Roberts R. J. (Робертс Р.) 187, 188
Robertson W. (Робертсон У.) 251
Robson J. M. (Робсон Дж.) 61, 62
Roby R. K. 455
Rodrigues I. 373
Roitt I. (Ройт А.) 398, 399
Romanakis K. 253
Romanov Georgij *см.* Романов Георгий
Roote J. 128
Rougvie A. E. 180
Rous P. (Раус П.) 402, 403, 405
Roux W. (Ру В.) 236
Rubin G. M. (Рубин Дж.) 17, 62, 128, 131, 170, 195, 298
Rusconi S. (Раскони С.) 182
Russell P. J. 10, 98, 99, 102, 104–106, 112, 116, 118, 123, 125, 126, 132, 133, 138, 142–145, 151, 154, 157, 159–169, 173, 176, 180, 191, 192, 195–197, 200, 206, 209, 210, 212–218, 220, 221, 224, 238, 243, 287, 308, 309, 377, 378, 379, 382, 383, 404, 409, 410, 412, 419 , 427, 430, 454, 455
Russel S. 336
Ryan F. J. (Райн Ф.) 9

Saccone G. 357
Saez L. 434
Sager R. (Сэджер Р.) 9, 454
Saiki R. (Саики Р.) 16
Sakamura T. (Сакамура Т.) 73
Salganik R. I. *см.* Салганик Р. И.
Salz H. K. 367
Sambruck J. (Сэмбрук Дж.) 165
Sanders G. P. 430
Sandler I. 20
Sandler L. 20
Sanger F. (Сэнгер Ф.) 17, 125, 168
Sassone-Corsi P. 434
Savvateeva E. V. *см.* Савватеева Е. В.
Sax N. (Сакс Н.) 73, 245
Schaffner S. (Шеффнер С.) 182
Schedl P. 185–187
Schell J. 206
Scherthan H. 253
Schmidt E. R. 199
Schnedl W. (Шнедл У.) 246
Schnieke A. E. 373
Schrader F. (Шрэдер Ф.) 40
Schrödinger E. (Шрёдингер Э.) 13, 107
Schultz J. (Шульц Дж.) 147, 254, 262
Schulz A. (Шульц А.) 73
Schurr T. G. (Шур Т. Г.) 458
Schwartz Yu. B. *см.* Шварц Ю. Б.
Scott H. S. 206
Sears E. R. (Сирс Е.) 73, 74, 77
Semeshin V. F. *см.* Семешин В. Ф.
Setlow R. B. (Сетлоу Р.) 219
Sharagina L. M. 434
Sharma A. (Шарма А.) 283
Sharp P. A. (Шарп Ф. А.) 15, 187, 188
Shaw C. (Шо К.) 246
Sheardown S. 366
Shell D. (Шелл Д.) 424, 425
Shen M. W. 91
Shen P. 186
Shepherd S. 185
Shields J. 444, 445
Shizuya H. 157, 161
Shou-Hsien Li 268
Sibilia M. 206
Sidorov B. N. *см.* Сидоров Б. Н.
Sidransky D. 412
Singer M. (Сингер М.) 9, 127, 128, 234, 394, 398
Sinnot E. W. (Синнот Э.) 39, 50, 82
Slizynska H. (Слизинска Х.) 68
Slot F. 277
Smith D. A. 308
Smith H. (Смит Х.) 153
Snell G. (Снелл Дж.) 397
Solovei I. *см.* Соловей И. В.
Sorsa V. 319
Southern E. (Саузерн Е.) 16, 165, 166, 201, 345
Spiegelman S. (Спигелмэн С.) 341
Spierer P. (Спирер П.) 16, 166, 297
Spradling A. (Спрадлинг А.) 17, 62, 142, 170, 172, 338
Srb A. M. 10, 81, 82, 369, 370, 371, 447, 451
Stahl F. W. (Сталь Ф.) 110, 112
Stansfield W. D. 10, 38, 39
Starikovskaya Y. B. *см.* Стариковская Е. В.
Steller H. 388, 389
Stern C. (Штерн К.) 44, 50
Sternberg R. J. 445, 448–451
Stewart C.-B. 268
Stikes A. R. 123

Stoneking M. 458
Strachan T. 206
Strasburger E. H. (Страсбургер Э.) 236, 244
Struhl K. 177, 178, 180, 297
Struhl G. 383
Sturtevant A. (Стёртевант А.) 12, 14, 40, 42, 45, 47, 64, 66, 88, 147, 236, 252, 289, 348
Sukernik R. I. *см.* Сукерник Р. И.
Sumner A. T. (Самнер Э.) 236, 253
Sutton E. 301
Sutton W. (Сэттон У.) 12
Suzuki D. T. 64
Suzuki Y. 317
Swanson C. P. (Соунсон К.) 253
Sybenga J. 234
Szauter P. 363

Tartof K. D. (Тартоф К.) 296, 299, 300, 301
Tatum E. (Тейтум Э.) 13, 16, 19, 100, 148
Taylor W. R. (Тейлор У. Р.) 244
Temin H. (Темин Х.) 407
Thummel C. S. 190
Tikhonov A. *см.* Тихонов А.
Tobler H. 279
Toder R. 366
Todd A. (Тодд А.) 108
Tonegava S. (Тонегава С.) 394
Torroni A. (Торрони А.) 243, 457, 458
Traverse K. L. 277
Trower M. K. 253
Tschermak E. (Чермак Э.) 11
Tshetverikov S. S. *см.* Четвериков С. С.
Tulchinsky E. M. *см.* Тульчинский Е. М.
Turner H. H. (Тернер Х. Х.) 76
Tye B. K. 273
Tyler-Smith C. 261, 262, 268

Udvardy A. 185, 187
Umesono K. 242, 243
Ursprung H. (Уршпрунг Г.) 370

Vaessin H. 185
Valente V. L. S. 426
Vargha-Khadem F. 436
Varmus H. E. (Вармус Х. Е.) 407
Vavilov N. I. *см.* Вавилов Н. И.
Vazquez J. 186, 187
Venter J. C. 128, 129, 131, 188, 189, 196, 243
Verkerk A. J. (Феркерк А.) 210
Villee C. (Вилли К.) 32, 39, 82, 445, 447, 449
Virchow R. (Вирхов Р.) 25
Vogelstein B. 412
Vogt O. (Фохт О.) 55
Volkova E. I. *см.* Волкова Е. И.
Voronina E. N. *см.* Воронина Е. Н.

Wadhams M. J. 455
Wagner E. F. 206
Wakayama T. 373
Wakefield M. J. 366
Walden R. 206
Waldeyer W. (Вальдейер В.) 236
Wallace D. C. (Уоллес Д. К.) 240, 243, 455, 458
Wallace R. A. 430
Walldorf U. 387
Wallrath L. L. 180, 294, 296, 297, 307, 308
Waterhouse J. 436
Watkins K. E. 436
Watson J. D. (Уотсон Дж.) 10, 14, 19, 20, 109, 110, 123, 180, 185, 206, 234, 235, 297, 298, 308, 398, 411
Watts-Tobin R. J. 126
Weber J. (Уэбер Дж.) 15
Weiling F. 18, 20
Weinberg G. (Вайнберг Г.) 413–415, 417, 418
Weinstein A. (Уэйнстайн А.) 18, 20, 40
Weismann A. (Вейсман А.) 10, 12, 22, 79, 236, 288, 371
Welch W. J. 339
West A. G. 186
White O. 128, 131, 243
Wiebe (Вибэ) 314
Wieschaus E. F. (Вишаус Э.) 380
Wieslander L. 340
Wilkins M. H. F. (Уилкинс М.) 14, 19, 109, 123
Willard H. F. 366, 367
Wilmut I. (Вилмут Я.) 19, 372, 373,
Wilson A. C. 458
Wilson C. 172, 183, 185, 201, 206
Wilson E. B. (Вильсон Э.) 12, 279, 284, 311, 313
Wilson H. R. 123
Wilson R. K. (Уилсон Р.) 17, 128
Winge O. (Винге О.) 72
Winkler G. (Винклер Г.) 70
Wintersberger E. 258, 268
Wolffe A. P. 308
Wright C. 387
Wright S. (Райт С.) 415–418
Wright T. R. F. 319
Wu C.-I. 264

Yanagimachi R. 373
Yang C.-C. 458
Yanofsky C. (Яновский Ч.) 148, 213
Young W. J. (Янг У.) 253

Zacharias H. 268
Zain C. 412
Zakian V. A. 270, 277
Zambryski P. (Замбрыски П.) 203, 206
Zeleny C. (Зелены Ч.) 40
Zhao K. 186, 187
Zhimulev I. F. *см.* Жимулёв И. Ф.
Zimm G. G. 89, 91, 139, 142
Zimmer K. (Циммер К.) 13
Zinder N. (Зиндер Н.) 14, 99

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Автополиплоидия 71
Агритоп 393
Аддитивности закон 88
Азотистая кислота 62, 214, 215
Азотистый иприт 61
Акридин 62, 215
Актинофаг 62
Аллелизм множественный 56, 57, 205
Аллелизма критерии 84
Аллель (аллеломорф) 32–34, 234
Аллополиплоидия 72, 73
— у пшениц 73
Альбинизм 38
2-Аминопурин 214
Амнион 81
Ампициллин 154, 155, 201
Амплификация 154, 342
Амфиполиплоидия 72, 73
Ангиотензин 152
Андрогенез 370
Анемия серповидно-клеточная 208
— Фанкони 225
Анеуплоидия 62, 70, 74, 75, 91
— сегментальная 75
Антиген 390, 391, 392, 393, 394, 396
Антикодон 212, 213
Антионкогены 408
Антиподы 322, 323, 326
Антитело *то же, что* Иммуноглобулин 294, 390, 392–396, 398
Апоптоз 387–389, 401
Арахнодактилия 55
Архебактерии (археи) 112, 428, 430
Асинапсис политенных хромосом 323, 324, 345
Атаксия спиноцеребральная 211
— телеангиэктазия (синдром Луи–Бара) 225
— Фридрихса 211
Атрофия спинобульбарная 211
— дентаторубропаллидолузианская 211
Ауксотроф 57, 100
Аутбридинг 421
Аутоиммунные заболевания 399
Аутосома 75
Ацентрический фрагмент 63

Бактериофаг *то же, что* Фаг 59, 98–100, 145, 158–160
умеренный 145
λ 19, 98, 99, 158–160, 162, 166, 227, 230, 231, 233
ϕX174 17

Балансер 66, 83
Барьер Хейфлика 270, 276
Белок HP1 277, 295, 347
Библиотека кДНК 161
Бивалент 73
Биотехнология 200, 203
Бластодерма 258, 376, 377, 378, 379
Бластомер 18, 258, 371
Бластула 258
Близнецовый метод 80
Близнецы
однояйцевые (идентичные, или монозиготные) 80, 81
разнояйцевые 80, 81
сиамские 80, 81
Блума синдром 225
Брадикинин 152
5-Бромурацил 214

Вектор 15, 154–160, 200, 204, 216
космидный 160
плазмидный *см.* Плазмида
фаговый 158, 160
челночные 160
Вид «синтетический» 74
Вилка репликационная 113, 115, 121
Вирус 60
Сендай 92
SV40 182

Галактоземия 55
β-Галактозидаза 150, 155, 181, 183
Гамета 32, 35
— нередуцированная 72
Гаплоидия 76
Гаплотип 262
Геликаза 103, 113, 115, 220, 228, 360
Геммула 10
Гемоглобин 197
Гемофилия 32, 95
Ген(ы) 12, 13, 21, 23, 107
взаимодействие 35
гомология 196
делимость 21, 147
дифференциальная активность 384
клонирование 16
компенсационный комплекс 425
структура 146–148
— интрон-экзонная 187–189, 365
химический синтез 15, 152
Ген-мутатор 214, 217

Ген-репортер 181, 182
Ген-репрессор 209
Генеалогический метод 83, 94
Генетика 12, 21
медицинская 26
поведения 431
популяционная 21
радиационная 26
Генетическая символика 31
Генетический анализ 83
— код 15, 123–126
— груз 417
Геномика 127
Генная инженерия 15, 153, 200, 206, 216
— «пушка» 203
— терапия 200, 204, 206
Геном 107, 127–131, 196 *см. также* Мобильные элементы
реорганизация у полиплоидов 283, 284
тотипотентность 371, 373
— бактерий 237
— дрожжей 243
— митохондрий 238, 241
— хлоропластов 241, 243
Геномная библиотека 16, 161, 204
Геномный проект 17, 127, 128, 188–190, 249, 385
Генотип 12, 127
Генофонд 413
Гены биоритмов 434
— брачного поведения (у дрозофилы) 432
— гомеозисные 199, 380, 385, 386
— обоняния 431
— регуляторные 149, 382
— структурные 149
— супрессоры опухолей 408, 410
— зрительной системы 431
Гербициды 157, 200, 203
Гермафродит 351, 353
Гетероаллели 84
Гетероаллельная комбинация (компаунд) 84
Гетеродуплекс 228, 231, 233
Гетерозис 420, 424, 425
Гетероплазмия 454, 455
Гетероплоидия 70
Гетерохроматин интеркалярный 266, 277, 344–347
— прицентромерный 69, 245, 254–268, 277, 289–292, 296, 297, 320, 342–344, 347–349
— теломерный 269, 276, 277, 298
Гибридизация *in situ* 83, 92, 93, 199, 201, 249–252, 259, 317, 348
Гибридный дисгенез 136
Гибриды 31
— межродовые 21
Гидроксиламин 62, 215
Гинандроморф 351, 352
Гистон 302–306, 309
модификация 304
«Глазки» репликации 113, 114, 121
Гликозилаза 219, 220
Гомеодомен (гомеобокс) 179, 196, 383, 385
Гомологических рядов в наследственной изменчивости закон 52, 53, 196
Гормон роста (соматотропин) 152
Гормоны стероидные, рецептор 179
Группа сцепления 46, 86, 87, 243, 244
— комплементации 85

Дауна синдром 75, 251
Де Санктиса–Качиони синдром 225
Делеция 62, 65–68, 75, 83, 141
Дезаминирование окислительное 214
Детерминация 374
Дигибрид 34
Диминуция хроматина 278–284
Дисгенез гибридный 136
Дистрофия миотоническая 211
ДНК 14, 107, 108
ведущая (лидирующая) цепь 115, 274
мутагенный эффект 61
отстающая цепь 114, 115, 270, 274, 275
процессинг у инфузорий 191
укладка908 наднуклеосомная 308–311
структура 108–110
— бактерий 238
— митохондрий 158, 205, 206, 238–242, 429, 454–458
— рекомбинантная 152
— сателлитная 259–261, 317
— хлоропластов 241–243
— «эгоистичная» 283
ДНК-аза 179, 180, 186, 306
ДНК-геликаза *см.* Геликаза
ДНК-зонд 162, 163, 165, 167
ДНК-лигаза 116, 161, 200, 216, 218–221
ДНК-полимераза 112, 115, 116, 169, 213, 216–221, 223, 234
— — *Taq* 168
ДНК-пуфы 341, 342
ДНК-топоизомераза *то же, что* Топоизомераза 113, 231, 311
кДНК 161, 162, 171
Длинные концевые повторы 133–135
Дозовая компенсация 346, 354–357, 359–368
Домен Прибнова 174, 175
— ТАТА (Хогнесса, Голдберга–Хогнесса) 176–181, 183
— СААТ 176, 177
— связывания с ДНК 178, 179
Доминирование 31–33
— неполное 33, 70
Донор (при конъюгации бактерий) 98
Дрейф генов (генетико-автоматические процессы) 415, 418
Дрожжи 17, 60, 118–121, 127, 178, 179
Дупликация 65–67, 69, 75, 83, 139, 141

Евгеника 437–439
Естественный отбор 415

Зародышевая плазма 10, 12
«Зеленая» революция 63

Идиограмма 245–247
Излучение ионизирующее 13, 214

Изменчивость 51
комбинативная 57
мутационная 51
наследственная 51
ненаследственная 51, 77
Имагинальный диск 181
Иммунитет 390–392
Иммунный ответ 373
Иммуногенетика 390, 412
Иммуноглобулин *см.* Антитело
Инбредная депрессия (вырождение) 421
— линия 421
Инбридинг 417, 420–424, 426
Инбридинга коэффициент 421, 422
Инверсия 64, 66, 141, 290
парацентрическая 64, 65
перицентрическая 64, 65
Инверсионный полиморфизм 66, 348
Ингибирование конечным продуктом 150
Индукция (ферментов) 149
Инсулятор 185, 186, 348
Интеграза 134, 230, 231, 233, 234
Интерсекс 351–353
Интерференция 47
Интерферон 152
Интрон 15, 140, 173, 187–192, 195, 196, 211, 271, 331, 395, 403, 405, 427

Канамицин 157
Канцерогенность 402
Карбенициллин 157
Кариотип 21, 245, 283, 288
Карликовость 225
Карта комплементационная 84, 85
— рестрикционная 162, 164, 167
Картирование генов 45, 83, 88–91, 348
— — рестрикционное 153, 154
Картирующая функция 88
— — Холдейна 88, 89
Кинетохор 285, 286
Кеннеди болезнь 211
Клайнфельтера синдром 75, 76
Кластер генов 149, 197, 199
Клеточный цикл
стадии 118–123
старт 119
точка проверки 119
Клонирование генов 152, 154, 155, 161, 164, 216, 331, 348
— животных 18, 19, 372
Кодон 123–125, 207
миссенс 207
нонсенс (стоп-кодон) 123, 124, 207, 212
частота использования 125
Кодоминирование 33
Коинциденция 47
Кокэйна синдром 225
Колхицин 74
Кольца Бальбиани 327, 330, 331, 340
Компаунд (гетероаллельная комбинация) 84
Компенсация дозы генов *см.* Дозовая компенсация
Компетентность 96
Комплементарность действия генов 35
— молекул 85
Комплементация межаллельная 84, 85
Конверсия 207, 234, 235
Конкатамер 160
Конкордантность 81, 82
Конъюгация у бактерий 100–106, 157
Коррекция (оснований ДНК) 117
«Косматые корни» 156
Корончатый галл 156
Космида 160
Котрансдукция 100
Котрансформация 98
«Кошачьего крика» синдром 69
Коэффициент интеллектуальности (I.Q.) 69, 210, 211, 445–449
Крисс-кросс наследование 41
Кроссинговер 43, 44, 48, 49, 141, 146, 207, 226, 230
двойной 46, 88, 96
механизм разрыв–воссоединение 227
митотический 48, 91
неравный 47
Ксантин 214
Ксеродерма пигментная 224
Кэп, кэпирование 173, 174, 241

Лактозный оперон *см.* Оперон
Лайонизация 363
Ламина 311
«Ламповые щетки» *см.* Хромосома
Лариат («лассо») 191, 192
«Лейциновая застежка» 178
Летали сбалансированные 58
Лидер 232
Лизогения 99, 158
Лимфоцит 390, 392–398
Линкер 161, 302
— межнуклеосомный 302
«Липкие» концы 153, 155, 161
Липосома 202

Макромутация 282
Макронуклеус (ядро вегетативное) 191, 193, 194, 271, 272, 281, 282, 318
Максама–Гилберта метод секвенирования 17, 168
Межаллельная комплементация 84, 85
Мейоз 48, 71–74, 226, 283, 312
Мёллера правило 251, 252
Менделизм 31
Менделя законы 11, 12, 18, 31, 32
Мета-женщины 75
Метастаз 400, 401, 411
Метилметансульфонат 62, 215
5-Метилцитозин 213
Миграция (поток генов) 415, 418
«Миграция ветви» 228, 229
Микронуклеус (ядро генеративное) 191, 193, 194, 271, 282
Метилаза 213
Микроклонирование 348
Микросателлит 262
Микроспора 245

Микроцефалия 69
Мини-хромосома 69, 113
Мисмэтч-репарация 220–222, 224, 225
Митоз (кариокинез) 118, 236, 254–256, 281, 304, 312, 409
Митохондрии, генетика 236, 238, 339
Мобильный элемент генома 16, 59, 131, 139, 145, 210, 213, 234, 261, 271
    ретротранспозон 132–135, 140, 141, 274
    Alu 138
    IS у микроорганизмов 103, 142–144
    LINE 138, 249, 366
    P у дрозофилы 62, 83, 136, 137, 140, 141, 170, 171, 183, 198, 200, 201, 233, 329
    SINE 138
Модификация 77–79
    адаптивная 78
    длительная 79
Мозаичность 291, 293
«Молекулярные часы» 427
Моносомик 74, 92
Моносомия 91
Морганизм 40
Морфогены 375, 376, 380
Морфоз 79
Мутагенез 207
    ген-специфический 216
    радиационный 61–63
    сайт-специфический 216
    химический 61
Мутагены 60, 61
    алкилирующие агенты 214, 217
    аналоги оснований 214
    гидроксилирующие агенты 214
    дезаминирующие агенты 214
    интеркалирующие агенты 215
    ионизирующие излучения 214
    модификаторы оснований 214
    ультрафиолетовый свет 214, 217, 219, 223, 224, 225
Мутации 13, 140, 207, 213, 415, 416 *см. также* Хромосомные перестройки
    внутригенные повторы 211
    «горячие» точки 209, 210, 214
    классификации 51, 53
    методы учета 57–59
    получение 83
    частота 60
    у мыши 60
    у человека 60
Мутация 51
    аморфная 51, 53
    антиморфная 51, 53
    ауксотрофная 57
    генеративная 51, 55
    гиперморфная 51, 57
    гипоморфная 51, 53
    гомеозисная 380
    доминантная 51, 52, 57, 58
    индуцированная 21, 26, 51, 57, 60
    летальная 51, 55, 61, 62, 69, 70, 76, 89
    миссенс 207, 209, 213
    молчащая 207, 209
Мутация
    нейтральная 208
    неоморфная 51, 53
    нонсенс 207–209, 213
    обратная 51, 55, 211–213
    прямая 51, 55, 211, 212
    реверсия 212, 213
    сдвига рамки считывания 208, 213, 215, 216
    системная 77
    соматическая 51, 55
    спонтанная 51, 57, 59, 140, 213, 214
    супрессорная 211, 212, 213
    точковая 51, 212, 269
    транзиция 207, 210, 213–216
    трансверсия 207, 210, 213
    условная 57
Мутационная теория 51

Направительное тело 41, 74
Наследование
    непрямое 10
    прямое 10
    приобретенных признаков 79
    сцепленное 12, 42
    — с полом 12, 40
    эпигенетическое 369
Наследственность 9, 10
— нехромосомная 452, 453
Неоламаркисты 21
Нерасхождение хромосом 41, 359
Ник 227
Ник-трансляция 220
Нозерн-блот анализ 167, 201
Нонсенс-кодон (стоп-кодон) *см.* Кодон
Нонсенс-супрессия 212
Норма реакции 80
Нуклеаза микрококковая 302, 304, 305
Нуклеосома 302–308
Нуклеоид 236–238, 243
Нуллисомик 74
Нуллисомия 91

Обратная транскриптаза 132, 133, 138, 152, 161, 162
Один ген — один фермент, принцип 13, 148
Оказаки фрагменты 115, 116, 270
Окраска хромосом
    многоцветная 249, 250
    по Фельгену 246, 249
    C 246, 249, 255, 259, 277, 278, 281, 282
    FISH 246, 249, 250
    G 246, 248, 250, 366
    H 246, 278
    Q 246, 282
    R 246, 249
    T 246, 249
Онкоген 204, 403, 405, 406
Онкогенетика 400–412
Онкогенные вирусы 402, 405
Ооцит 314, 320, 321
Оператор 149
Оперон 15, 103, 149–151, 197, 223
    лактозный 149–151, 209
    триптофановый 152

Опухоль доброкачественная 400
— злокачественная 400–403
Ориджин репликации *см.* Репликация

Палиндром 153, 186
Пангенез 10
Панмиксия 414
Парасегмент 378, 380
Патау синдром 75
Пенетрантность 55, 56
Перекрывающихся делеций метод 68
Перенос генов 141
Пигментная ксеродерма 224
Плазмида 102, 154–158, 183, 216, 329
 2μ-кольцо дрожжей 156, 231
 Ri-плазмида 156
 Ti-плазмида 156
 F-фактор 102, 103, 156
 спасение 200, 201
Пластида 236
Плейотропия 55
Повторы в ДНК 129–131, 205, 259–264, 279
Позиционная информация 375
Пол, определение 350–368
 балансовая теория 353–357
Полиаденилирование 173, 174
Полилинкер 155, 156, 201
Полимеразная цепная реакция 16, 167, 204, 205, 251
Полимерия 37
Полиплоидия 62, 70–74, 283, 284, 426
— соматическая 70
Полиплоидный ряд 71, 72
Полирепликонность 119
Половой хроматин (тельце Барра) 363, 368
Популяция 26, 348, 413
Праймер (затравка) 116, 167, 169
Пререпликационный комплекс 121
Преформизм 369
Признак 31
 доминантный 32
 рецессивный 32
 качественный 38
 количественный 38, 39
Прокариоты 112, 149, 173, 174, 428, 430
Промотор 140, 149, 150, 174–180, 182, 184, 186, 195, 196, 211, 223, 306, 307, 406
— канцерогенеза 402
Пронуклеус 377
Протоонкоген 140, 405–407
Профлавин 215
Процессинг ДНК 191, 193, 194, 282
— РНК 173
Псевдоген 196, 197, 427
Пуф 185, 186, 199, 327, 330–337

Развитие эмбриональное 375
Рак наследственный неполипозный прямой кишки 225
Рекомбинация 35, 227
 общая (гомологичная) 226, 234
 сайт-специфическая 103, 172, 226, 230, 231, 234
 случайная 226, 232, 233
Рекон 148
Репарация 177, 207, 213, 217, 220, 224, 234
 пострепликативная 222, 224
 склонная к ошибкам (SOS) 223, 224
 эксцизионная 218, 219, 224, 225
Репликация 14, 110–123, 213, 241, 268, 305, 342, 347
 инициация 113, 114, 116, 118–121
 матричный принцип 14, 21
 ориджин 113, 117, 119, 121, 154, 157, 294
 терминация 117
 фокус 122
— поздняя 257, 258
— у эукариот 117
Репликон 117, 121, 122
Реплисома 116
Репрессия, репрессор 149
Ресинтез видов 73
Рестриктаза (эндонуклеаза рестрикции) 153, 154, 158, 163
Рестрикционный сайт 15, 153, 160, 164
Ретинобластома 408
Ретровирус 135, 204, 404, 406
Ретротранспозон *см.* Мобильный элемент генома
Решетка Пэннета 32
Реципиент (клетка) 97, 98, 100, 101
Рибосома 173
РНК информационная (матричная, мРНК) 174
— рибосомная (рРНК) 197, 198
— транспортная (тРНК) 197, 198, 212
РНК-аза 161, 162, 286
РНК-полимераза 151, 172–180, 183–223, 337
 сигма(σ)-фактор 174, 175
РНК-праймер 116, 270, 274, 275
Родословная 94, 95, 206

Сайленсинг 294, 295, 298
Сантиморган (морганида) 46
Саркома Рауса 402, 405
Саузерн-блот анализ 165, 166, 201, 264
Сверхдоминирования теория 425
Сверхсамка 352, 354
Сверхсамец 352, 354
Секвенирование 17, 168, 169
Селекция 63, 200
Синапсис соматический 319, 321
Синдром приобретенного иммунодефицита 398, 399
Синергиды 322, 323
Синонимические замены нуклеотидов 427, 428
Синтения 251, 252
Синцитий 377
Скаффолд хромосом 309, 310
Скрещивание
 селективные схемы 89
— анализирующее 33
— дигибридное 34
— моногибридное 31, 35
— полигибридное 34
— реципрокное 40
Соматостатин 152
Соматотропин (гормон роста) 152
Сорт 53
Спейсер 187, 197, 198

Сплайсеосома 191, 192
Сплайсинг 173, 188–191, 331
Субтеломерная последовательность 193
Супермутагены 62
Суперпродуцент 63, 64
Сцепление генов *см.* Наследование
Сэнгера метод секвенирования 168

ТАТА-последовательность 176–182
Таутомеры 214
Теломера 69, 139, 141, 160, 193, 245, 269, 271–274, 276, 282, 308
Теломераза 274–276
Тельце Барра (половой хроматин) 363, 368
Тепловой шок 179, 180, 185, 186, 195, 196, 199, 292, 306, 329, 336–339, 348
Терминация репликации 117
— транскрипции 195, 196
Тетрасомик 74
Тетраплоид 71, 72
Тетрациклин 154
Тиминовый димер 214, 217, 222, 223
Топоизомераза 113, 231, 311
Тотипотентность генома 371, 373
Транзиция 207, 210, 213–216
Трансверсия 207, 210, 213
Трансгенные организмы 17, 200, 203, 204
Трансдетерминация 375
Трансдукция 14, 99–101
абортивная 99, 100
общая, или неспецифическая 99
специфическая 99, 100
Транскрипт 172, 174
Транскриптосома 178, 186
Транскрипция 178, 212, 241
активатор 179
терминатор 149, 150, 173, 195, 196
терминация 195, 196
факторы 175–178, 185, 336, 383
Транслокация *см.* Хромосомные перестройки
Трансляция (синтез белка) 212, 241, 243
Трансплантация (пересадка) ядер 18, 19, 371, 372
Транспозаза 132, 134–137, 140, 170
Транспозиция 131, 132
Транспозон 132, 134, 135, 138, 142, 171, 172
Трансфекция 169, 202
Трансформация у бактерий 14, 95–98, 160
— у животных и растений 17, 169–172, 201, 216, 232
— плазмидами 155
Триплоид 72
Триптофансинтетаза 213
Триптофановый оперон 150
Трисомик 74, 75
Трихотиодистрофия 225
Тубулин 74
«Тупые» концы 153

Унивалент 73

Фаг *см.* Бактериофаг
Фаговый вектор 158–160
Фенокопии 79
Фенотип 12, 32
Филадельфийская хромосома 67, 402, 407
Фокус репликации 122
Фосфодиэстераза 220
Фотореактивация 217, 219, 224
Футпринтирование 176

Харди–Вайнберга закон 413–415
Хиазма 227
Холлидея структура 228, 229
Хорея Хантингтона 211
Хорион 81
Хроматида 236, 319, 323
Хромодомен 196
Хромомер 246, 308, 311–313, 315, 324–327
Хромосомные перестройки 62, 63, 83, 91, 141, 269, 344, 345
транслокация 62, 66, 67, 251
— робертсоновская 251
транспозиция 131
Хромосомы 12, 13, 20, 23, 43–45, 70, 83, 107, 127, 236–288
дифференциальная окраска *см.* Окраска хромосом
критическая масса 246
«Парижская номенклатура» 246, 248
междиски 186
упаковка ДНК 302
фрагментация 62
число 246
энзиматическое переваривание 249
хромоцентр 254, 319, 342, 343
— A 288
— B 288
— E 282
— S 282
— акроцентрические 20
— бактерий 230
— — искусственные 156
— вирусов 231, 236
— гомеологичные 252, 253
— гомологичные 70, 230
— дрожжей 243
— — искусственные 150
— интерфазные 77
— клеточных органелл 236
— «ламповые щетки» 236, 312–317
— метацентрические 20, 251
— митотические 20, 244–253, 308–310
— политенные 65, 68, 69, 93, 186, 236, 271, 281, 312, 318–349
— прокариот 237
«Хромосомная ходьба» 16, 165, 166, 201, 348
«Хромосомные прыжки» 201, 348
Хромосомный мост 63

«**Ц**ентральная догма» молекулярной биологии 15, 80, 107
Центромера 139, 245, 246, 269, 273, 285–287, 308
локализованная 285
диффузная (голоцентрическая) 278, 285
Циклин 118, 119
Циклин-зависимые киназы 118, 119
Циклогексимид 333

«Цинковые пальцы» 178
Цис-транс-тест 148
Цистрон 148, 150
Цитокины 391
Цитотип 136

Чистоты гамет закон 32

Шайна–Дальгарно последовательность 241
Шерешевского–Тернера синдром 75, 76

Эдвардса синдром 75
Экзон 15, 139, 173, 187–192, 194, 195, 211, 266, 271, 331, 403
Экдизон 332–336, 348
Экспрессивность 55, 56
Эксцизия 218
Электропорация 202
Электрофореграммы 33
Электрофорез 165
Элиминация хроматина (у инфузорий) 281
— хромосом 282
Эндонуклеаза рестрикции *см.* Рестриктаза
Энхансер 140, 172, 176, 177, 182–184, 186
Эписома 103
Эпистаз 37, 425
Эпитоп 393
Этидиумбромид 215
Этилметансульфонат 62
Эукариоты 112, 173, 175, 176, 197, 226, 236, 237, 428, 430
Эуплоиды 70
Эухроматин 245, 254, 255, 267, 268, 290, 292, 296, 297
Эффект Дубинина 21, 289, 299, 300
— основателя 418
— положения 21, 277, 289–301
модификаторы 277, 293–296, 345
— — мозаичного типа 289
— — стабильный 289

Ядерный матрикс 310
Ядрышко 327, 339, 341
Ядрышковый организатор 308
Яйцеклетка (яйцо) 369, 375–378
Ядро 237, 238, 257, 288, 318, 320, 339–370, 373, 377, 404, 406 *см. также* Макронуклеус, Микронуклеус, Трансплантация ядер

Zhimulev I. F.

General and molecular genetics. Textbook for University students, fourth edition. Novosibirsk, Siberian University Press, 480 p. (In Russian)

ABSTRACT

Although the science of genetics is only about 100 years old it has become an indispensable component of almost all research in modern biology and medicine. A continual flood of discoveries in genetics not only expands our understanding about heredity but also affects our daily lives. Today genetics is viewed as a core of biology. These achievements are reflected in this book, which is a textbook of new generation. This written for the university students.

The edition is divided into six parts that reflects broad divisions of modern genetics:

1. Main definitions of classic genetics (Chapters 1–5). Chapter 1 is a historical introduction to genetics. It provides historical scetch of development of the discipline in the world. Special part of the chapter is devoted to peculiarities of history of Genetics in Russia and Soviet Union. In the Chapter 2 description of Mendel's experiments is used to introduce the principles of segregation and independent assortment. Chapter 3 deals with chromosomes: their behavior and the facts that genes reside on chromosomes. The chromosome concept leads naturally to the idea of linkage. General regularities of variability are the subject of Chapter 4. Description of the methods of genetic analysis, both classic and molecular genetic is given in the Chapter 5.
2. The central part of the book is a two-chapter sequence emphasizing molecular genetics. Chapter 6 introduces the structure and properties of genomes; it details the structure and function of transposable elements in both prokaryotes and eukaryotes and shows how these mobile elements can participate in mutagenesis. Chapter 7, the longest one, describes the gene organization. The same chapter covers gene cloning and manipulation and shows how one branch of genetics has evolved into a kind of engineering.
3. The following 15 chapters expanded these themes. Chapter 8 illustrates specific aspects of mutagenesis, DNA repair, crossing over and gene conversion.
4. Chapters 9 to 13 cover data on chromosome organization.
5. Chapters 14 through 22 present actions of genes in various genetic systems: during sex determination and dosage compensation (Chapter 14) and during development (Chapter 15). Chapter 16 is about immunogenetics and Chapter 17 is about the molecular genetics of cancer with special emphasis on the behavior of oncogenes. The book contains two-chapter sequence on population genetics. Chapter 18 deals with introductory population genetics, including selection, genetic drift, inbreeding, mutation and gene flow. Chapter 19 describes inbreeding and heterosis and their practical application. Chapter 20 gives principles of molecular evolutionary genetics. The book is concluded by Chapters (21 and 22) on the genetics of behavior of Drosophila and mammals.
6. Chapter 23 deals with genetics of mitochondria and chloroplasts from both classical and molecular perspectives.

www.sup99.ru
СИБИРСКОЕ УНИВЕРСИТЕТСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

Для писем: 630058, Россия, г. Новосибирск, а/я 134
Тел./факс: (383) 332-52-32, 332-99-30, 330-50-19, 330-50-23
E-mail: Главная редакция: tat_2006@sup99.ru
Торговый отдел: sup99@mail.ru
Книга – почтой: post_book@sup99.ru

Представительство в Москве:
Тел./факс: (496) 304-24-23 E-mail: daurkin_sup@mail.ru

Учебное издание

Жимулёв Игорь Фёдорович

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Выпускающий редактор *Т. С. Швайковская*
Менеджер проекта *И. Р. Русаков*
Редактор *Г. И. Сергеева*
Корректоры *Е. В. Ушакова, Л. А. Федотова*
Обработка иллюстраций *С. Л. Ярославцев*
Обложка *В. А. Кривобоков*
Компьютерная верстка *В. Н. Морошкин*

Соответствует гигиеническим требованиям к книжным изданиям
(сан.-эпид. закл. № 54.НС.05.953.П.013186.12.05 от 26.12.05)

Подписано в печать 21.06.07. Формат 60×84/8.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 55,8. Уч.-изд. л. 51,4. Заказ № 21.

Сибирское университетское издательство
630058, Новосибирск, ул. Русская, 39

Отпечатано в типографии Сибирского университетского издательства
630117, Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1